D 5

UNTERSUCHUNGEN ZUR KONSTITUTION, SYNTHESE UND BIOSYNTHESE VON PILZFARBSTOFFEN

INAUGURAL–DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn

vorgelegt von

RUPERT HERRMANN

aus Urberach

BONN 1980

D 5

UNTERSUCHUNGEN ZUR KONSTITUTION, SYNTHESE UND BIOSYNTHESE VON PILZFARBSTOFFEN

INAUGURAL–DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn

vorgelegt von

RUPERT HERRMANN

aus Urberach

BONN 1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn

Referent: *Prof. Dr. Wolfgang Steglich*
Korrerefent: *Prof. Dr. Manfred T. Reetz*

Tag der Promotion: 19. September 1980

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Steglich

in der Zeit von April 1976 bis März 1980 am Institut für Organische Chemie und Biochemie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn durchgeführt.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. W. Steglich, möchte ich für zahlreiche wertvolle Anregungen, die großzügige Förderung dieser Arbeit und das mir entgegengebrachte Wohlwollen herzlich danken.

Mein Dank gilt auch:

- Herrn Dr. H. Besl in Regensburg für die Durchführung von Verfütterungsexperimenten und Isolierungen von Pilzfarbstoffen,
- den Damen und Herren der analytischen Abteilung, die meinen "Sonderwünschen" stets zugänglich waren und
- meinen Kollegen im Labor und Arbeitskreis, besonders den Herren Dipl.-Chemikern Dr.N.Engel und R.Lohmar, für viele Diskussionen, Kritik und die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Ernst und Ursula gewidmet

For still there are so many things

that I have never seen:

in every wood in every spring

there is a different green.

J.R.R. Tolkien

Abkürzungen

abs.	wasserfrei
Ac	Acetyl
Ar	Aryl
br	verbreitert
BSA	N,O-Bis(trimethylsilyl)acetamid
d	Tag(e)
DC	Dünnschichtchromatogramm
DBU	1,5-Diazabicyclo[5.4.0]undec-5-en
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DMS	Dimethylsulfat
DMSO	Dimethylsulfoxid
h	Stunde(n)
HMPT	Hexamethylphosphorsäuretriamid
i.Vak.	im Vakuum
MCPBA	meta-Chlorperbenzoesäure
ME	Masseneinheiten
PE	Petrolether
Ph	Phenyl
RT	Raumtemperatur
Schmp.	Schmelzpunkt
TFA	Trifluoressigsäure
TFAA	Trifluoressigsäureanhydrid
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Tetramethylsilan

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
ZUSAMMENFASSUNG		1
ALLGEMEINER TEIL		4
1.	Einleitung	4
2.	Aus Phenylpropaneinheiten entstandene Pilzfarbstoffe	5
2.1.	Verbindungsklassen	5
2.1.1.	Terphenylchinone	5
2.1.2.	Grevilline	9
2.1.3.	Pulvinsäuren (Tetronsäuren)	11
2.1.4.	Pulvinone	14
2.1.5.	Diarylcyclopentanone	14
2.2.	Biogenetische Zusammenhänge der Phenylpropan-Pilzfarbstoffe	16
2.3.	Chemische Zusammenhänge der Phenylpropan-Pilzfarbstoffe	18
SPEZIELLER TEIL		20
3.	Biogeneseuntersuchungen	20
3.1.	Allgemeines	20
3.1.1.	Biogeneseuntersuchungen an freiwachsenden Fruchtkörpern	20
3.1.2.	Menge des zu verfütternden Vorläufers	22
3.1.3.	Art der Applikation	23
3.1.4.	Bestimmung der ^{13}C-Anreicherung	23
3.2.	Biogeneseuntersuchungen an Terphenylchinonen	24
3.2.1.	Biogenese von Polyporsäure in *Hapalopilus nidulans*	24
3.2.2.	Biogenese von Atromentin in *Paxillus atrotomentosus*	26

Seite

3.3. Biogeneseuntersuchungen an Grevillinen 30
3.3.1. Biogenese von Grevillin A, B und C in *Suillus grevillei* 30
3.3.2. Biogenese von Grevillin D in *Suillus granulatus* und *Suillus luteus* 34
3.4. Biogeneseuntersuchungen an Hydroxypulvinsäuren 35
3.4.1. Biogenese von Xerocomsäure und Variegatsäure in *Boletus erythropus* und *Boletinus cavipes* 35
3.4.2. Biogenese von Hydroxypulvinsäuren in Mycelkulturen von *Serpula lacrymans* 39
3.4.3. Biogenese von Variegatsäuremethylester und Variegatorubin in Mycelkulturen von *Hygrophoropsis aurantiaca* 41
3.5. Zusammenfassung zu den Biogeneseuntersuchungen 41

4. Strukturaufklärungen 45
4.1. Orange-1 aus Fruchtkörpern von *Paxillus panuoides* und *Paxillus atrotomentosus* 45
4.2. Orange-2 aus Fruchtkörpern von *Paxillus panuoides* und Kulturen von *Omphalotus olearius* 48
4.3. Orange-3 aus Fruchtkörpern von *Paxillus panuoides* 50
4.4. Orange-4 aus Fruchtkörpern von *Paxillus panuoides* var. *ionipus* 52
4.5. Violett-1 aus Kulturen von *Paxillus panuoides* 53
4.6. Rubin-1 aus Kulturen von *Serpula lacrymans* 59
4.7. Pigmente aus Fruchtkörpern von *Boletus morissii* 61
4.8. Pigment aus Fruchtkörpern von *Suillus americanus* 62
4.9. Pigmente aus Fruchtkörpern von *Boletus retipes* und *Boletus ornatipes* 63
4.10. Diarylcyclopentandione aus Fruchtkörpern von *Gyrodon lividus* 67
4.11. Acetat eines gelben Pigmentes aus Kulturen von *Cordyceps ophioglossoides* 70
4.12. Pigmente aus Kulturen von *Oudemansiella badia* 71

Seite

5. Synthesen 74

5.1. Synthese der ^{13}C-markierten Verbindungen 74
5.1.1. ^{13}C-Phenylalanin und ^{13}C-Tyrosin 74
5.1.2. ^{13}C-Phenylbrenztraubensäure 75
5.1.3. ^{13}C-Grevillin A 75
5.1.4. ^{13}C-Atromentin 77
5.1.5. ^{13}C-Atromentinsäure 78
5.2. Synthese von mono- und diacylierten Terphenylchinonen über die Natrium- und Thalliumsalze 79
5.3. Versuche zur selektiven Darstellung von monoacylierten Terphenylchinonen 81
5.3.1. Durch Umlagerung von Grevillinen 81
5.3.2. Über cyclische Carbonate von Terphenylchinonen 82
5.4. Carbonate und Urethane von Terphenylchinonen 83
5.5. Versuche zur biomimetischen Synthese von Violett-1 85
5.5.1. Herstellung der epoxidierten Sorbinoylderivate 86
5.5.2. Cyclisierung zu den ortho-Chinonen 87
5.5.3. Versuche zur Wasserabspaltung 90

6. Spektroskopische Daten von Terphenylchinonderivaten 90

6.1. IR-Spektren von acylierten Terphenylchinonen 90
6.2. ^{1}H-NMR-Spektren von Terphenylchinonderivaten 91
6.3. ^{13}C-NMR-Spektren von Terphenylchinonderivaten 92

EXPERIMENTELLER TEIL 99

7. Geräte und Materialien 99

8. Biogeneseuntersuchungen 101

9. Isolierung und Charakterisierung von Pilzinhaltsstoffen 109

10. Synthesen 120

ANHANG 140

LITERATURVERZEICHNIS 144

ZUSAMMENFASSUNG

A) Biogeneseuntersuchungen

Mit Hilfe von ^{13}C-markierten Vorläufern wurden einzelne Schritte in der Biogenese der Terphenylchinone, Grevilline und Pulvinsäuren aufgeklärt. Die Verfütterungsexperimente wurden teilweise an Fruchtkörpern höherer Pilze, die in ihrer natürlichen Umgebung wuchsen, vorgenommen. Der Nachweis des Einbaus erfolgte durch ^{13}C-NMR- und massenspektrometrische Messungen. Die gewonnenen Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Bei Verfütterung von markiertem Phenylalanin und Tyrosin wird in die an den aromatischen Ringen hydroxylierten Phenylpropan-Pilzfarbstoffe ausschließlich Tyrosin eingebaut. Phenylalanin kommt nur als Vorläufer von Polyporsäure in Frage.
2. Durch Hydroxylierung von Grevillin A bzw. Hydroxylierung und Umlagerung werden die Grevilline B, C und D gebildet. Atromentinsäure wird über Xerocomsäure zu Variegatsäure hydroxyliert.
3. Die Grevilline kommen als Vorläufer von Terphenylchinonen und Pulvinsäuren nicht in Frage.
4. Methylierte Variegatsäuren in Kulturen von *S. lacrymans* entstehen wahrscheinlich nicht aus Ligninbruchstücken, sondern aus methylierten Vorstufen der Variegatsäurebiogenese.

B) Strukturaufklärungen

Von verschiedenen höheren Pilzen wurden Inhaltsstoffe untersucht und deren Konstitution ermittelt bzw. erste Hinweise zur Konstitution gegeben:

1. Bei einer Reihe von orangefarbigen Pigmenten (Orange-1 bis Orange-4) aus Pilzen der Gattung *Paxillus* handelt es sich um monoacylierte Atromentinderivate. Orange-1 enthält einen ungewöhnlichen cis,trans-Sorbinoylrest und ist offensichtlich der biogenetische Vorläufer der epoxidierten Verbindung Orange-4.

2. Violett-1, ein violett gefärbtes,ortho-chinoides Atromentinderivat aus Kulturen von *Paxillus panuoides* ist biogenetisch mit Orange-4 verknüpft.

3. Ein rot gefärbtes Pigment, Rubin-1, aus Kulturen von *Serpula lacrymans*, besitzt die Konstitution eines methylierten Isoxerocomorubins.

4. Aus der Stielbasis von *Boletus morissii* wurde eine polare, gelb gefärbte Substanz isoliert, bei der es sich nach ersten Untersuchungen um ein Glycosid der Variegatsäure handelt.

5. In einem Pilz der Gattung *Suillus* (wahrscheinlich eine Varietät von *S.americanus*) wurde ein mit Schwefelsäure rotverfärbendes Pigment nachgewiesen, bei dem es sich um ein bisher unbekanntes Grevillin handeln könnte.

6. Die spektroskopischen Daten zweier gelber Pigmente aus *Boletus retipes* und *B.ornatipes* sprechen für das Vorliegen von Verbindungen, die ein Chinonmethidsystem enthalten.

7. Bei einer aus *Gyrodon lividus* isolierten, mit $K_3[Fe(CN)_6]$/ $NaHCO_3$ blauschwarz verfärbenden Substanz, handelt es sich um das bisher unbekannte Enantiomere von Chamonixin.

8. Das Acetat eines gelben Pigmentes aus *Cordyceps ophioglossoides* besitzt die Konstitution eines Benzochromons.

9. In Mycelkulturen von *Oudemansiella badia* werden zwei C_{18}-Pigmente gebildet, bei denen es sich um Ylidenbutenolide mit einer Polyenin-Seitenkette handelt.

C) Synthesen

1. Von $Ba^{13}CO_3$ ausgehend wurden die für die Verfütterungsexperimente benötigten ^{13}C-markierten Vorläufer synthetisiert. Die markierten Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin sind auf dem gewählten Syntheseweg mit einer Gesamtausbeute von 50% gut zugänglich.
   Durch die Verwendung von DBU wurde ein bisher nur in schlechter Ausbeute verlaufender Cyclisierungsschritt bei der Grevillinsynthese entscheidend verbessert.

2. Ein Teil der aus Pilzen der Gattung *Paxillus* isolierten monoacylierten Atromentinderivate wurde synthetisiert und mit den natürlichen Verbindungen verglichen. Für die selektive Darstellung von monoacylierten Terphenylchinonen wird eine Methode, die von den cyclischen Carbonaten der Terphenylchinone ausgeht, angegeben. Durch Umsetzung der cyclischen Carbonate mit Alkoholen und sekundären Aminen wurden einige aktivierte Carbonate und Urethane hergestellt.

3. Analog der Biogenese wurde versucht, Violett-1 bzw. Derivate von Violett-1 zu synthetisieren. Die auf diesem Weg erhaltene dimethylierte Verbindung von Violett-1 ist im chromatographischen Verhalten identisch mit dem aus natürlichen Material erhaltenen methylierten Produkt.

D) Spektroskopische Daten

Die Spektren eines großen Teils der isolierten und synthetisierten Verbindungen wurden gemessen und interpretiert.
Die im ^{1}H-NMR- und ^{13}C-NMR-Spektrum von monoacylierten Atromentinderivaten zu beobachtende Äquivalenz der beiden aromatischen Ringe ist auf eine Acylgruppenwanderung zurückzuführen.

Allgemeiner Teil

1. Einleitung

In der Naturstoffchemie beschäftigt man sich seit dem letzten Jahrhundert mit den Inhaltsstoffen höherer Pilze. Dabei sind neben den Pilzgiften und den in jüngerer Zeit isolierten Antibiotika besonders die auffälligen Pilzfarbstoffe von Interesse.

Mit der Entwicklung neuartiger Isolierungs- und Analysentechniken während der letzten Jahrzehnte begann der eigentliche Aufschwung in der Chemie der Pilzfarbstoffe, nachdem in den zwanziger Jahren schon einige Strukturen aufgeklärt worden waren.

Dem Naturstoffchemiker geht es bei Untersuchungen an Farbstoffen aus höheren Pilzen um die Entdeckung unbekannter Verbindungen und deren Synthese. Für den Botaniker haben sie als chemotaxonomisches Merkmal eine große Bedeutung, denn oft ist erst durch die genaue Kenntnis von Struktur und Biogenese der Inhaltsstoffe eine eindeutige Zuordnung eines Pilzes zu einer bestimmten Familie oder Gattung möglich.

In der vorliegenden Arbeit wird über Untersuchungen zur Biogenese von bekannten Pilzfarbstoffen, bei denen zum ersten Mal ^{13}C-markierte Vorläufer direkt an Fruchtkörper höherer Pilze verfüttert wurden, berichtet.
Außerdem werden einige neue Pilzinhaltsstoffe vorgestellt und deren Isolierung, Strukturaufklärung und Synthese beschrieben.

2. Aus Phenylpropaneinheiten entstandene Pilzfarbstoffe

Hauptsächlich in Basidiomyceten und besonders in Pilzen der Ordnung *BOLETALES* findet man eine Reihe von Farbstoffen, die über den Shikimisäureweg aus Phenylpropaneinheiten [+)] entstanden sind und deren enge biogenetische Verwandtschaft offensichtlich ist. Für die Verwandtschaft sprechen einige durchgeführte Biogeneseuntersuchungen, sowie das öfter zu beobachtende gemeinsame Vorkommen der verschiedenen Farbstofftypen in ein und demselben Pilz.

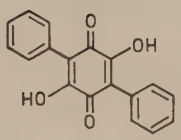
Im folgenden werden einige typische Vertreter dieser Pilzfarbstoffe vorgestellt. Für einen umfassenderen Überblick über bisher bekannte Verbindungen [1-4)] sowie über deren Vorkommen in den verschiedenen Pilzarten [5)] muß auf die Literatur verwiesen werden.

2.1. Verbindungsklassen

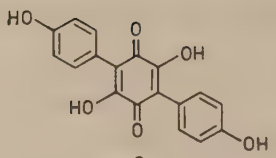
2.1.1. Terphenylchinone [6)]

Zu den Terphenylchinonen (2,5-Diaryl-benzochinone) zählen solche Pilzpigmente wie die schon seit langem bekannte Polyporsäure (1) [7)] und das Atromentin (2) [8)]. Während 2 öfter in *BOLETALES*-Pilzen anzutreffen ist, findet man 1 in Flechten und Porlingen. Ebenfalls aus einem Porling wurde "Leucomelon" [9a)] isoliert, dem nach neueren Untersuchungen die Konstitution 3 zukommt [9b)].

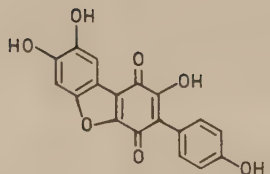
+) Phenylpropane sind z.B. Phenylalanin, Tyrosin, Phenylbrenztraubensäure, 4-Hydroxyphenylbrenztraubensäure und die verschiedenen Zimtsäuren.



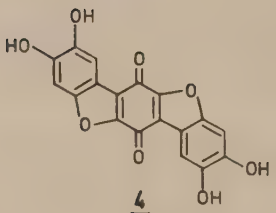
1



2



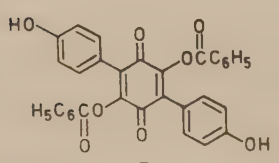
3



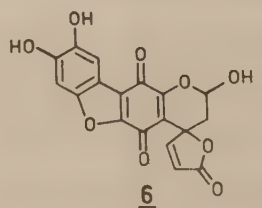
4

Die schwarzviolette Thelephorsäure (4) [10] ist in zahlreichen Arten von Basidiomyceten verbreitet, und das Bis-benzoat des Atromentins, Aurantiacin (5) [11], kommt in *Hydnum*- und *Hydnellum*-Arten vor.

Eine etwas abgewandelte Struktur zeigt das aus Leucomelon durch oxidative Spaltung eines aromatischen Ringes entstandene Hydnuferrugin (6) [12].

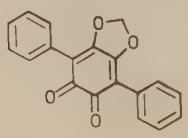


5

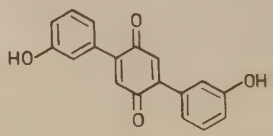


6

Beim rotgefärbten Phlebiarubon (7) [13] wird der Hydroxychinonring durch eine Methylengruppe in der ortho-chinoiden Form fixiert.

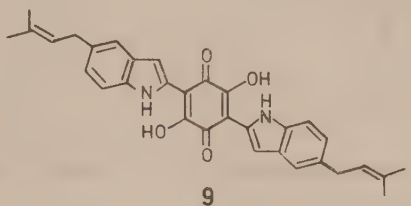


7



8

Von den bisher genannten Pigmenten (alle aus Basidiomyceten oder Flechten) unterscheidet sich das Volucrisporin (8) [14] (aus *Volucrispora aurantiaca*, Fungi imperfecti) durch die Abwesenheit der Hydroxy- bzw. Ethergruppen am Chinon-Teil und das ungewöhnliche Substitutionsmuster an den aromatischen Ringen. Cochliodinol (9) [15] (aus *Chaetomium globosum* und *Ch. cochliodes*, Ascomycetes) ist ein "Terphenylchinon",bei dem die üblicherweise vorhandenen Phenyl- bzw. Hydroxyphenylreste durch prenylierte Indoleinheiten ersetzt sind.



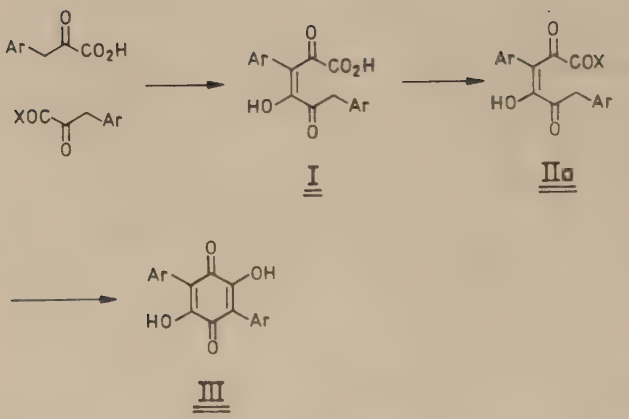
9

Einige der erwähnten Terphenylchinone liegen im Pilz in Form ihrer Leukoverbindung (Hydrochinon) vor. Erst bei der Aufarbeitung werden diese zum Chinon oxidiert, es sei denn, sie sind - wie z.B. die Leukoverbindung des Aurantiacins durch Benzoylierung [16] oder die der Thelephorsäure durch Methylierung [17] - "blokkiert". Es ist anzunehmen, daß bei bisher durchgeführten Pilzuntersuchungen farblose Leukoverbindungen von Terphenylchinonen oft übersehen wurden.

Die Biogenese des Terphenylchinongerüstes kann man sich nach einem Vorschlag von READ und VINING [18] durch einfache Kondensation von zwei unverzweigten Phenylpropaneinheiten vorstellen (Schema 1).

Für Polyporsäure (1) z.B. käme als direkter Vorläufer Phenylbrenztraubensäure (aktiviert) in Frage. Atromentin (2) könnte durch Dimerisierung von 4-Hydroxyphenylbrenztraubensäure gebildet werden.

Während die Biogenese von Atromentin noch nicht untersucht wurde, konnte bei Verfütterungsexperimenten an Flechten [19] gezeigt werden,



Schema 1. Vorschlag zur Biogenese des Terphenylchinongerüstes (X= aktivierende Gruppe)

daß Polyporsäure als Zwischenprodukt bei der Bildung von Pulvinsäurederivaten aus Phenylpropaneinheiten auftritt.

Untersuchungen, die sich direkt mit der Biogenese von Terphenylchinonen befassen, wurden an Mycelkulturen bei Phlebiarubron (7) [20] +) aus *Phlebia strigosozonata*, Volucrisporin (8) [21] ++) aus *Volucrispora aurantiaca* und Cochliodinol (9) [15] +++) aus *Chaetomium globosum* durchgeführt. Die hierbei gefundenen Ergebnisse bestätigten den Vorschlag von READ und VINING und zeigten, daß die Biogenese der Terphenylchinone nicht über den Zimtsäureweg führt.

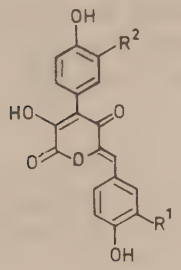
+) Als Vorläufer des Phlebiarubrons wurde ^{13}C-markiertes Phenylalanin verfüttert und dessen Einbau durch massenspektrometrische Untersuchung des Phlebiarubron-Leukoacetates nachgewiesen. Das C-Atom der Methylendioxy-Gruppe wird von Methionin geliefert.

++) Im Falle des Volucrisporins wurden durch ^{14}C-Markierungsexperimente Phenylalanin, Phenylmilchsäure, meta-Tyrosin, Glucose und Shikimisäure als Vorläufer nachgewiesen. Ein Einbau von Tyrosin, Dopa und verschiedenen Zimtsäuren wurde nicht beobachtet. Die Dimerisierung zum Terphenylchinongerüst erfolgt wahrscheinlich mit zwei Molekülen 3-Hydroxyphenylbrenztraubensäure, d.h. der aromatische Ring wird vor der Kondensation hydroxyliert.

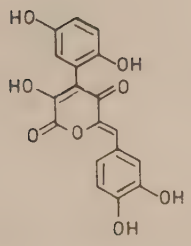
+++) In Cochliodinol wird, wie erwartet, ^{14}C-markiertes Tryptophan und Mevalonolacton eingebaut.

2.1.2. Grevilline

Bei den Grevillinen handelt es sich um orangegelbe Farbstoffe, die sich mit konzentrierter Schwefelsäure intensiv rot bzw. violett verfärben und deren Vorkommen typisch für Pilze der Gattung *Suillus* ist. Die Strukturen von vier verschiedenen Grevillinen wurden in den letzten Jahren von BESL, STEGLICH et al. [22,23] aufgeklärt. Sie enthalten ein Benzylidenpyronsystem und unterscheiden sich durch die Art der Hydroxylierung an den aromatischen Ringen.



		R^1	R^2
Grevillin A	10	H	H
Grevillin B	11	OH	H
Grevillin C	12	OH	OH

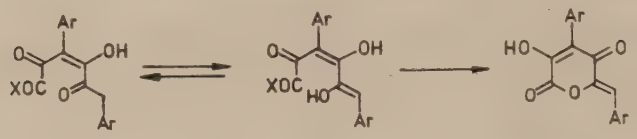


Grevillin D 13

Biogeneseuntersuchungen an Grevillinen wurden bisher noch nicht durchgeführt. Die Bildung der Grevilline wäre nach STEGLICH [4] auf dem in Schema 2 gezeigten Weg denkbar.

Als Vorläufer tritt hierbei das schon bei der Biogenese der Terphenylchinone formulierte Zwischenprodukt II auf (siehe auch Schema 1, Seite 8). Der Ringschluß erfolgt aber nicht durch C-C-Verknüpfung, sondern durch Lactonisierung des enolisierten Produktes IIb. 4-Hydroxyphenylbrenztraubensäure liefert dann

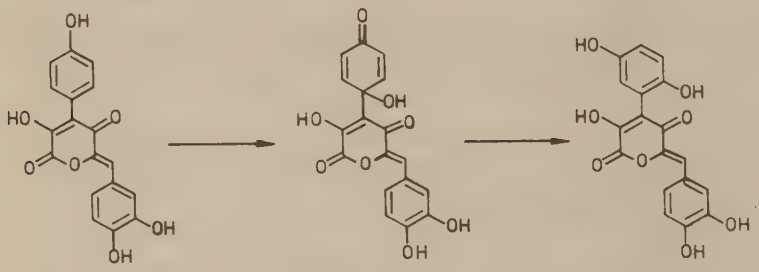
nicht Atromentin (2) sondern Grevillin A (10).



IIa IIb IV

Schema 2. Mögliche Biogenese des Grevillingerüstes (X= aktivierende Gruppe)

Interessant ist der vorgeschlagene Mechanismus zur Biogenese von Grevillin D (13) [4,23b] (Schema 3). Dabei soll Grevillin B (11) para-hydroxyliert und über das gebildete Chinol 14 in 13 umgelagert werden.



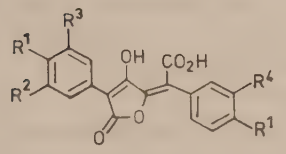
11 14 13

Schema 3. Mögliche Biogenese von Grevillin D (13)

Die Umlagerung ist der beim Abbau der aromatischen Aminosäuren auftretenden Umwandlung von 4-Hydroxyphenylbrenztraubensäure in Homogentisinsäure analog.

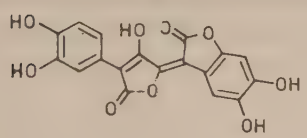
2.1.3. Pulvinsäuren (Tetronsäuren) [24]

Pulvinsäuren wurden zuerst aus Flechten isoliert; innerhalb der Ordnung *BOLETALES* sind die an den aromatischen Ringen hydroxylierten Pulvinsäuren weit verbreitet [5,25]. Typische Vertreter sind: Pulvinsäure (15) [26], Atromentinsäure (16) [27], Xerocomsäure (17) [27], Variegatsäure (18) [27,28] und Gomphidsäure (19) [29].

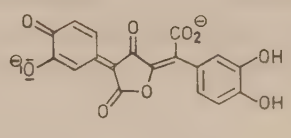


	R^1	R^2	R^3	R^4
15	H	H	H	H
16	OH	H	H	H
17	OH	OH	H	H
18	OH	OH	H	OH
19	OH	OH	OH	H

Als Begleiter der Variegatsäure (18) findet man oft deren tiefrot gefärbtes Oxidationsprodukt Variegatorubin (20) [30], das auch bei der Oxidation von 18 mit Kupferacetat [4,30] entsteht.



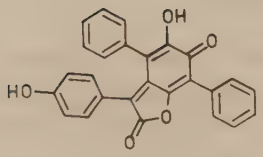
20



21

Für die bei einigen Boletaceen bei Verletzung des Fruchtfleisches auftretende Blauverfärbung können Xerocomsäure (17) und Variegatsäure (18) verantwortlich sein. Durch Sauerstoff und Oxidasen oder in vitro mit $K_3[Fe(CN)_6]/NaHCO_3$-Lösung wird z.B. 18 zum blaugefärbten Hydroxychinonmethid-Anion 21 oxidiert [27,28].

Das aus einem holzzerstörenden Pilz (*Peniophora sanguinea*) isolierte Xylerythrin (22) [31] kann seiner Struktur nach entweder zu den Terphenylchinonen oder zu den Pulvinsäuren gerechnet werden. In jüngster Zeit durchgeführte Biogeneseuntersuchungen an

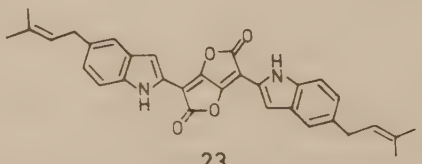


22

Mycelkulturen von *P.sanguinea* [32] deuten darauf hin, daß als direkter Vorläufer von 22 eine Pulvinsäure wahrscheinlicher ist als das Terphenylchinon Polyporsäure (1). Vom biogenetischen Gesichtspunkt her würde es sich deshalb bei 22 um eine Pulvinsäure handeln, an die eine C_6C_2-Einheit ankondensiert ist.

MOSBACH [33] und MAASS et al. [34] untersuchten die Biogenese von Pulvinsäuren in Flechten. Das Ergebnis dieser Untersuchungen machte deutlich, daß die Pulvinsäurederivate aus unverzweigten Phenylpropanen über Polyporsäure 1 als Zwischenprodukt gebildet werden. Die Überführung von 1 in Pulvinsäuren erfolgt dabei durch eine oxidative Ringöffnung des Terphenylchinons [+].

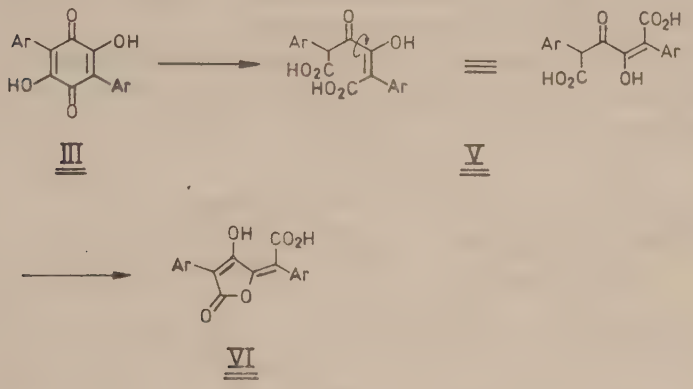
Bei Cochliodinon (23), einem Pulvinsäurelacton, das zusammen mit Cochliodinol (9) vorkommt, wurde der Einbau von ^{14}C-Tryptophan nachgewiesen [15].



23

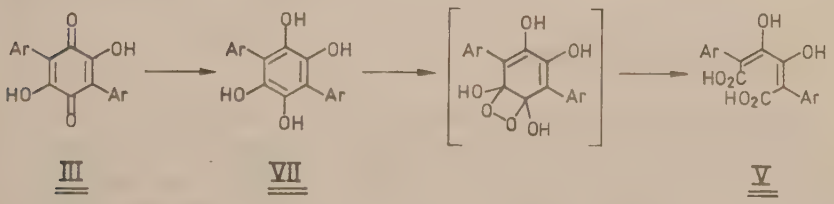
[+] Der von MAASS [34c] vorgeschlagene detaillierte Mechanismus zur Bildung von Pulvinsäurederivaten, bei dem an Pyridoxal gebundene Zwischenprodukte eine Rolle spielen sollen, scheint allerdings weniger wahrscheinlich zu sein, da er keine befriedigende Erklärung für die beobachtete Equilibrierung der enolischen- und Carbonylkohlenstoffe in Pulvinsäurederivaten bei Verfütterung von 1-^{14}C- und 2-^{14}C-Phenylalanin bietet.

Für die Hydroxypulvinsäuren aus höheren Pilzen ist eine analoge Biogenese wie bei den Pulvinsäurederivaten aus Flechten zu erwarten [4] (Schema 4). Dabei sollte z.B. Atromentin (III = 2) direkt Atromentinsäure (VI = 16) liefern.



Schema 4. Mögliche Biogenese der Hydroxypulvinsäuren

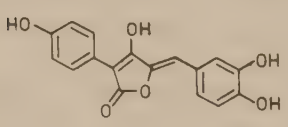
Die oxidative Ringspaltung des Terphenylchinons III könnte so verlaufen, daß zunächst die Leukoverbindung VII entsteht, die dann durch eine Oxygenase [35,41a] zu V gespalten wird:



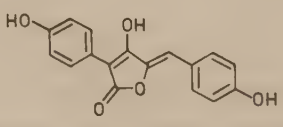
Dies würde bedeuten, daß in Pilzen, in denen Leuko-Terphenylchinone akkumuliert werden (z.B. in Fruchtkörpern von *P.atrotomentosus*), die für die Ringspaltung notwendigen Oxygenasen fehlen bzw. nicht aktiviert sind.

2.1.4. Pulvinone [24]

Pulvinsäuren, bei denen die Carboxylgruppe fehlt, werden als Pulvinone bezeichnet.
Aus dem Goldröhrling (*Suillus grevillei*) wurde das Trihydroxypulvinon 24 isoliert [36], möglicherweise ein bei der Aufarbeitung aus Grevillin B entstandenes Artefakt.
Aus Kulturen von *Aspergillus terreus* konnte die Dihydroxy-Verbindung 25 und eine Reihe weiterer, prenylierter Pulvinone [37] erhalten werden.



24

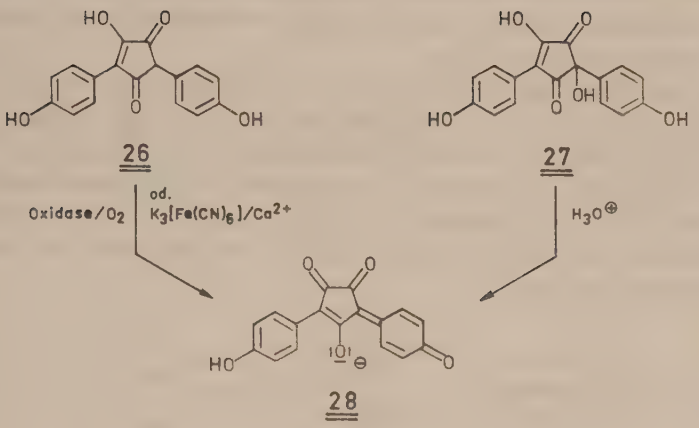


25

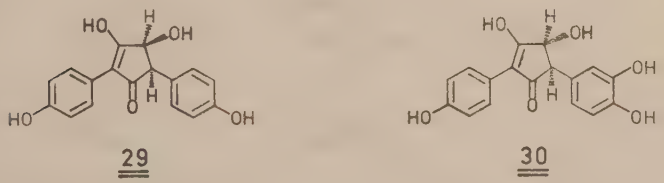
Die Biogenese der Pulvinone könnte durch Decarboxylierung und anschließende Lactonisierung des bei der oxidativen Ringspaltung von Terphenylchinonen auftretenden Zwischenprodukts V (Schema 4) erfolgen [24].

2.1.5. Diarylcyclopentanone

Aus dem Kornblumenröhrling (*Gyroporus cyanescens*) wurden die blaßgelben Farbstoffe Gyrocyanin (26) und Gyroporin (27) isoliert [38]. Die bei Verletzung des Kornblumenröhrlings auftretende Blauverfärbung wird nicht, wie bei vielen anderen Spezies der Familie *BOLETALES*, durch das Oxidationsprodukt einer Hydroxypulvinsäure, sondern durch das bei der Oxidation von 26 entstehende Anion 28 verursacht [38].
Die Biogenese von 27 über ein Chinonmethid der Struktur 28 ist offensichtlich.



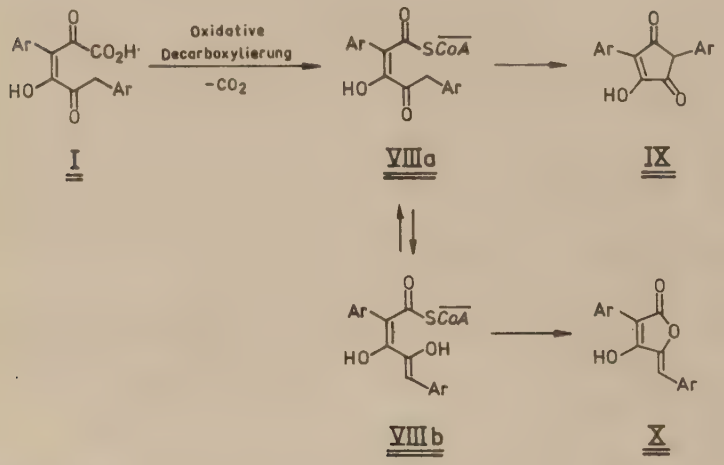
Das Anion 28 erhält man auch bei der Oxidation von Chamonixin (29) [39], einer fast farblosen, optisch aktiven Verbindung aus *Chamonixia caespitosa*. Biogenetisch könnte 29 durch stereoselektive Reduktion von 26 entstehen.



Eng verwandt mit 29 ist Involutin 30, das von EDWARDS et al. [40] aus *Paxillus involutus* isoliert wurde, und das für die rotbraune Verfärbung des Fruchtfleisches bei Verletzung des Pilzes verantwortlich ist. Das aus *P.involutus* isolierte 30 besitzt die umgekehrte absolute Konfiguration wie Chamonixin (29) aus *Ch.caespitosa* [39].

Für die Biogenese des Grundgerüstes der Diarylcyclopentanone werden zwei Modelle diskutiert. EDWARDS et al. [40] vermuten einen Weg, der über die entsprechenden Pulvinsäuren führt. Ein kürzerer, von STEGLICH et al. [38] vorgeschlagener Weg, beinhaltet die

über eine Benzilsäureumlagerung verlaufende Ringverengung von Terphenylchinonen, analog der chemischen Überführung von Atromentin (2) in Gyroporin (27).
Eine weitere Möglichkeit der Biogenese von Cyclopentanonen sei hier aufgezeigt (Schema 5). Hierbei wird das bei der Terphenylchinon- und Grevillinbiogenese formulierte Zwischenprodukt I (siehe auch Schema 1) zunächst durch oxidative Decarboxylierung [35] in das aktivierte Säurederivat VIII überführt, welches zum Cyclopentanon vom Gyrocyanintyp oder nach Enolisierung zum Pulvinon cyclisieren kann [+].

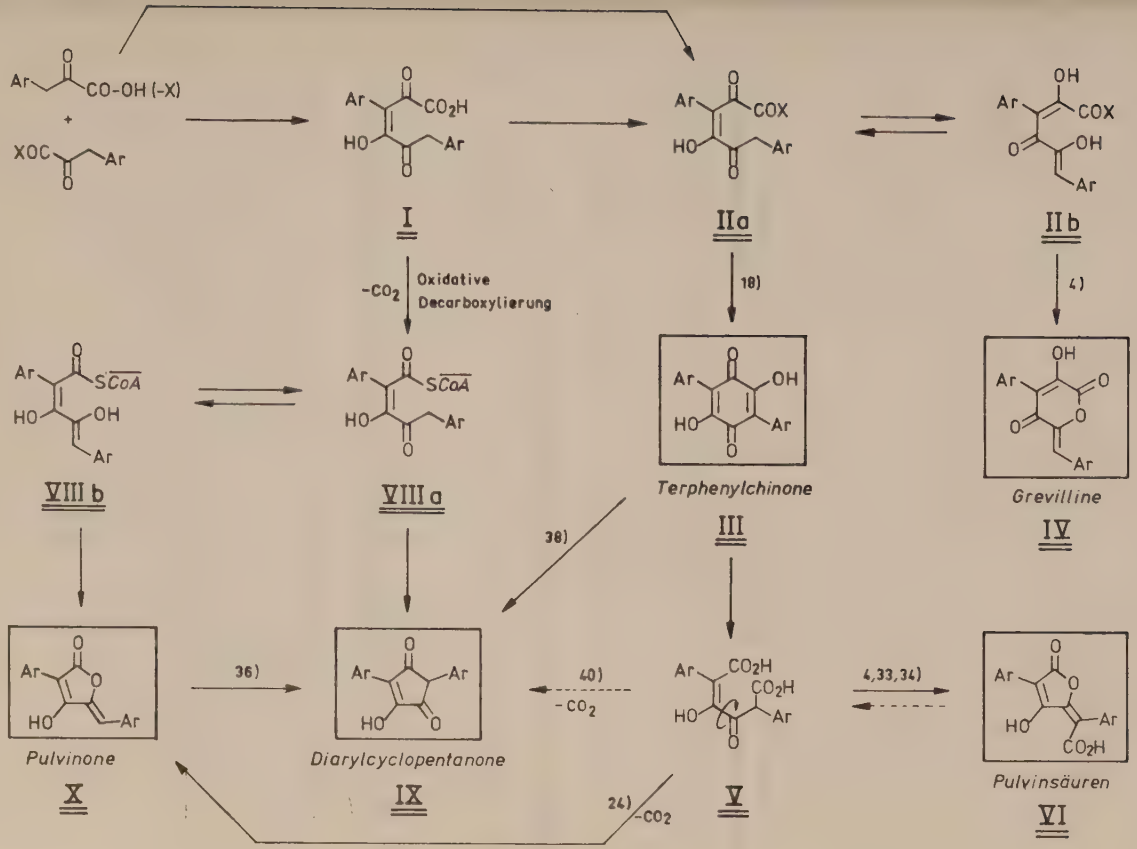


Schema 5. Vorschlag zur Biogenese der Diarylcyclopentanone und Pulvinone

2.2. Biogenetische Zusammenhänge der Phenylpropan-Pilzfarbstoffe

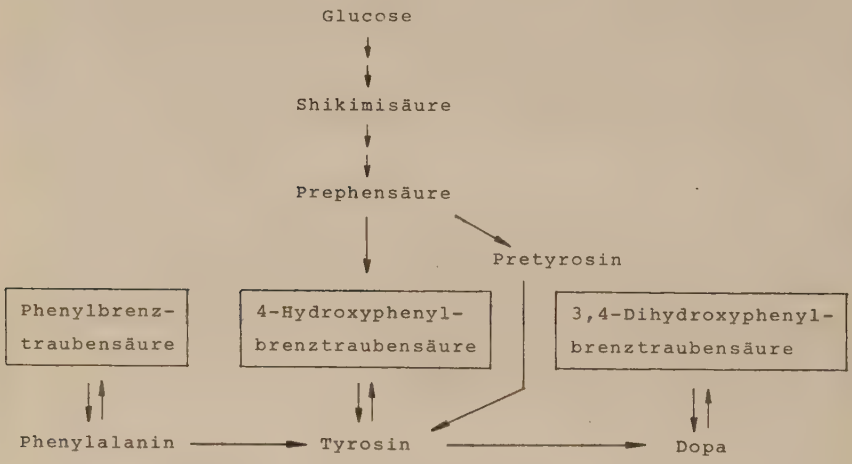
In Schema 6 sind die vorgeschlagenen biogenetischen Zusammenhänge zwischen den Phenylpropan-Pilzfarbstoffen noch einmal zusammenfassend dargestellt.

[+] Eine direkte Cyclisierung von I zum 5-Ring mit anschließender Decarboxylierung und Oxidation wäre ebenfalls ein möglicher Weg.



Schema 6, Vermutete Biogenese einiger *BOLETALES*-Pigmente

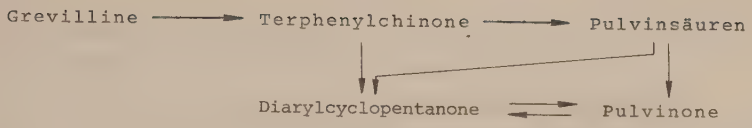
Die mögliche Biogenese der als Vorläufer in Frage kommenden Arylbrenztraubensäuren zeigt das Schema 7 [41]



Schema 7. Biogenese der Arylbrenztraubensäuren

2.3. Chemische Zusammenhänge der Phenylpropan-Pilzfarbstoffe

Die genannten Verbindungsklassen lassen sich teilweise chemisch ineinander überführen (Schema 8). Die Umwandlungen sind aber oft nur an Verbindungen möglich, bei denen die aromatischen Ringe keine Hydroxygruppen tragen oder bei denen die Hydroxygruppen z.B. als Methylether geschützt sind. In einigen Fällen wurde die chemische Umwandlung als Modell für die Biogenese vorgeschlagen.



Schema 8.

Durch Basenkatalyse lassen sich Grevilline in die isomeren Terphenylchinone umlagern [42]. Diese können mit H_2O_2/Eisessig [43], $Pb(OAc)_4$ [44] oder DMSO/Ac_2O [45] zu Pulvinsäurelactonen oxidiert und durch Hydrolyse in die Pulvinsäuren überführt werden. Atromentin (2) wird mit wäßriger $K_3[Fe(CN)_6]$-Lösung, welche Ca^{2+}-Ionen enthält, unter Ringverengung zum Anion 28 und Gyroporin (27) oxidiert [38]. Cyclopentanone vom Typ des Gyrocyanins stehen mit Pulvinonen in einem thermischen Gleichgewicht [25,37a]. Durch Decarboxylierung von Pulvinsäuren erhält man ebenfalls Pulvinone [36]. Wenn man methylierte Pulvinsäureester mit methanolischer KOH behandelt, entstehen Cyclopentanonderivate [46].

Ausführlichere Angaben zu den chemischen Beziehungen zwischen den Phenylpropan-Pilzfarbstoffen findet man in der Dissertation von ZIPFEL [25].

SPEZIELLER TEIL

3. Biogeneseuntersuchungen

3.1. Allgemeines

3.1.1. Biogeneseuntersuchungen an freiwachsenden Fruchtkörpern

Will man die Biogenese von Farbstoffen aus höheren Pilzen untersuchen, so wird man normalerweise Mycelkulturen der Pilze züchten [47], um damit Experimente vornehmen zu können.

Oft beobachtet man aber, daß in einer Mycelkultur keine oder andere Farbstoffe als im Fruchtkörper produziert werden [5c,48]. Da es sehr schwierig ist, unter künstlichen Bedingungen Fruchtkörper von z.B. *BOLETALES*-Pilzen zu erhalten, ist es in einigen Fällen unumgänglich, die Verfütterungsversuche direkt an Fruchtkörpern in ihrer natürlichen Umgebung vorzunehmen [49]. Bisher gibt es nur wenige Beispiele, bei denen solche Versuche erfolgreich durchgeführt wurden.

Durch Verfütterung ^{14}C-markierter Verbindungen an Fruchtkörper von *Dermocybe sanguinea* konnten STEGLICH et al. [49,50] einige biogenetische Beziehungen zwischen den im Pilz gebildeten Anthrachinonpigmenten klären.
EUGSTER et al. [51] berichten von Untersuchungen zur Biogenese von Muscarin, bei denen Einbauversuche an Fruchtkörpern keine Schlüsse zuließen oder "erratische Resultate" ergaben.
MUSSO et al. [52] konnten bei ^{14}C-Biogeneseexperimenten an Pigmenten des Fliegenpilzes (*Amanita muscaria*) nur einen geringen Einbau in einer Farbstoff-Fraktion nachweisen, als sie die Verfütterungen an freiwachsenden Fruchtkörpern vornahmen.

Während man Biogenesestudien an Mycelkulturen relativ einfach unter definierten und kontrollierten Bedingungen und zu jedem beliebigen Zeitpunkt vornehmen kann, treten bei freiwachsenden Fruchtkörpern einige Probleme auf, auf die hier hingewiesen werden soll:

- Für Verfütterungen, die nur während der Zeit des Pilzwachstums, also im Sommer und Herbst durchgeführt werden können,

müssen geeignete Pilze vorhanden sein. Nicht überall und unter ungünstigen klimatischen Bedingungen nicht immer, wachsen die benötigten Pilzarten.

Bei den von uns durchgeführten Biogeneseuntersuchungen konnte dieses Problem teilweise dadurch umgangen werden, daß einige Verfütterungen in Zusammenarbeit mit H.BESL und A.BRESINSKY vom Botanischen Institut der Universität Regensburg durchgeführt wurden.

- Bei eßbaren oder besonders auffälligen Pilzen muß damit gerechnet werden, daß geimpfte Exemplare von Pilzsammlern mitgenommen oder zerstört werden.

  Dies war während der Durchführung der Arbeit leider öfter der Fall, und man kann dem nur dadurch vorbeugen, indem man die geimpften Pilze mit Laub oder Ästen abdeckt, so daß sie nicht oder nur schwer entdeckt werden können.

Ein Vorteil gegenüber den oft mehrere Monate dauernden Biogeneseexperimenten an Mycelkulturen ist, daß die Fruchtkörper sehr schnell wachsen und somit eine hohe biochemische Aktivität und hohe Einbauraten bei Verfütterung geeigneter Vorläufer erwarten lassen.

Für Experimente im Freien und an eßbaren Pilzen sind radioaktive Vorläufer aus strahlenschutztechnischen Gründen nicht geeignet. Hier bietet sich die in den letzten Jahren verstärkt zur Anwendung kommende Technik der Biogeneseuntersuchung mit ^{13}C-markierten Verbindungen an, die bereits erfolgreich bei Untersuchungen der Alkaloidbiogenese in intakten höheren Pflanzen angewandt wurde [53].

Über die Methodik von ^{13}C-Biogenesestudien, über Vor- und Nachteile und über bisher durchgeführte Experimente wird in mehreren Übersichtsartikeln berichtet [54-56].

Im folgenden sollen einige Aspekte, die im Zusammenhang mit der Verfütterung ^{13}C-markierter Vorläufer an Fruchtkörper von Pilzen interessieren, näher erläutert werden.

3.1.2. Menge des zu verfütternden Vorläufers

Bevor ein ^{13}C-Biogeneseexperiment durchgeführt wird, sind in der Regel Versuche mit ^{14}C-markierten Substanzen nötig [55], um Aussagen über günstigste Verfütterungsbedingungen und die zu verfütternde Menge an ^{13}C-Vorläufer zu erhalten. Aber wie schon erwähnt, sind für Freilandversuche radioaktive Substanzen nicht geeignet, und man ist bei den ^{13}C-Verfütterungen auf eine Abschätzung der für eine nachweisbare Anreicherung notwendigen Vorläufermenge angewiesen. Negative Resultate können dann bedeuten, daß der Vorläufer nicht eingebaut wurde oder daß die applizierte Menge nicht ausreichte.

Es ist nicht empfehlenswert, von Anfang an einen großen Überschuß an Vorläufer anzubieten, da dies immer einen starken Eingriff in das Stoffwechselgeschehen des Pilzes bedeutet und zu Wachstumsstörungen führen kann (vgl. z.B. Lit. [21]). Um hohe Momentankonzentrationen zu vermeiden, ist es am günstigsten, den Vorläufer über die Dauer des Pilzwachstums an mehreren Tagen hintereinander in kleinen Portionen zu applizieren.

Je nach Größe des Fruchtkörpers, der in ihm enthaltenen Farbstoffmenge und der zu erwartenden Einbaurate, sind für eine Verfütterung ca. 0.1-1 mmol ^{13}C-Vorläufer (90%) pro Fruchtkörper notwendig, um mit Sicherheit einen Einbau nachweisen zu können. Ein sicherer Nachweis erfordert eine Verdopplung des natürlichen ^{13}C-Anteils in einem angereicherten C-Atom (Verdünnung $\approx$ 100, bei 90% angereichertem Vorläufer [55]. Bei Pilzen, die nur wenig Metabolit enthalten, muß der Vorläufer an mehrere Exemplare verfüttert werden, da mindestens 10-20 mg gereinigter Pilzfarbstoff für die Messungen der Anreicherung benötigt werden.

3.1.3. Art der Applikation

Die Applikation der ^{13}C-markierten Substanzen erfolgt am besten durch Impfung einer wäßrigen Lösung in Stiel und Hut der Fruchtkörper. Größere Flüssigkeitsmengen, die durch die oft schlechte Löslichkeit der Vorläufer bedingt sind, können mit Hilfe eines in den Pilz gesteckten Glastubus [+)] appliziert werden. Die in den Tubus gefüllte Lösung wird innerhalb mehrerer Stunden vom Pilz aufgesaugt.

Statt wäßriger Lösungen können auch wäßrige Suspensionen oder Lösungen der Vorläufer in DMSO geimpft werden [57)]. Bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchen konnte bei Verfütterung von Suspensionen allerdings nur in einem einzigen Fall ein Einbau nachgewiesen werden.

3.1.4. Bestimmung der ^{13}C-Anreicherung

Für Bestimmungen des ^{13}C-Gehaltes in markierten Substanzen kommen die verschiedenen Methoden der ^{13}C-NMR-Spektroskopie [56,58)] und die Massenspektrometrie in Frage [59)].

In der vorliegenden Arbeit wurden im ^{13}C-NMR (BB-Modus) und MS Vergleichsmessungen mit den entsprechenden nichtmarkierten Verbindungen unter möglichst identischen Bedingungen durchgeführt.

Aus dem ^{13}C-NMR wurde der Gehalt eines markierten C-Atoms, nach Normierung der Spektren von markierter und nichtmarkierter Verbindung, nach

$$\text{Atom-\%} = \frac{I_M}{I_V} \cdot 1.1$$

I_M = Integral des C-Atoms im Spektrum der markierten Verbindung

I_V = Integral des C-Atoms im Spektrum der Vergleichssubstanz

berechnet.

+) Bei dem Glastubus handelt es sich um ein dünnwandiges Glasrohr (Ø ~15 mm, Länge 100 mm), das zu einer Spitze von ca. 3 mm ausgezogen ist.

Um die Berechnungen bei den massenspektrometrischen Gehaltsbestimmungen zu vereinfachen, wurden (M-1)-Signale durch Aufnahme der Spektren unter low-voltage-Bedingungen (ca. 12 eV) unterdrückt [59]. Das für die Berechnungen angewandte Verfahren (s.Anhang) ermöglicht die direkte Bestimmung des ^{13}C-Gehaltes eines markierten C-Atoms in Atom-% bzw. die Bestimmung der Anteile von einfach- und mehrfach-markierten Molekülen in Mol-%.

Die ^{13}C-Anreicherung, Atom-%-Überschuß, ergibt sich nach:

Atom-%-Überschuß = Atom-% - 1.1

Für Bestimmungen von Einbaurate [57] und Verdünnung [57] müssen die (Atom-%-Überschuß)-Werte eingesetzt werden.

3.2. Biogeneseuntersuchungen an Terphenylchinonen

3.2.1. Biogenese von Polyporsäure in *Hapalopilus nidulans*

Bisher wurde noch keine Untersuchung durchgeführt, die sich direkt mit der Biogenese von Polyporsäure (1) befaßt. Der Hauptgrund dafür dürfte sein, daß es erst 1974 MOSBACH et al. [60] gelungen ist, eine Mycelkultur zu erhalten, die Polyporsäure produziert.

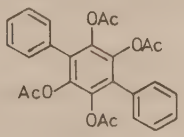
In dem auf Eichen wachsenden *Hapalopilus nidulans* kommt 1 bis zu 35% (bez. auf Trockenmasse) vor. Für die Absicht, ^{13}C-Biogeneseuntersuchungen direkt an Fruchtkörpern durchzuführen, schien *H. nidulans* gut geeignet zu sein. Die relativ einfache Biogenese von 1 - zwei Phenylbrenztraubensäureeinheiten müssen miteinander kondensieren (s.Kap. 2.1.1., Schema 1, Ar = Phenyl) - ließ bei Verfütterung eines geeigneten Vorläufers (z.B. ^{13}C-Phenylalanin 31*) [+] einen guten Einbau erwarten.

[+] Die Verbindungsnummern von synthetisierten ^{13}C-markierten Substanzen mit einem Gehalt von 90 Atom-% ^{13}C sind mit * gekennzeichnet.

31* 1

Bei einem im Herbst 1978 durchgeführten Versuch (Versuch T1) wurde an zwei, in ihrer natürlichen Umgebung wachsende junge Fruchtkörper von *H.nidulans* DL-[3'-^{13}C]Phenylalanin (31*) verfüttert (Daten zur Verfütterung siehe Exp.Teil) und die aus den geimpften Pilzen isolierte Polyporsäure im ^{13}C-NMR und MS untersucht. Dabei konnte aber keine Erhöhung des natürlichen ^{13}C-Anteils festgestellt werden.

Da im Massenspektrum von 1 der (M+2)-Isotopenpeak durch im Erlaßsystem entstehendes Hydrochinon überdeckt wird [61], wurde zur Sicherstellung des Ergebnisses auch noch das Tetraleukoacetat 32 der Polyporsäure hergestellt und vermessen. Aber auch hier war keine Zunahme des ^{13}C-Gehaltes zu beobachten.



32

Um festzustellen, ob Phenylalanin überhaupt als Vorläufer von 1 in Frage kommt, wurde ein Exemplar von *H.nidulans* mit radioaktivem Material (L-[u-^{14}C]Phenylalanin) geimpft (Versuch T2). Wie erwartet, zeigte sich bei diesem Versuch, daß Phenylalanin sehr gut in Polyporsäure eingebaut wird. Die Einbaurate [+)] betrug 17.3%.

+) $$\text{Einbaurate} = \frac{\text{spez.Akt.[}\mu\text{Ci/mmol]Produkt}\cdot\text{[mmol]Produkt}\cdot 100}{\text{spez.Akt.[}\mu\text{Ci/mmol]Vorläufer}\cdot\text{[mmol]Vorläufer}}$$

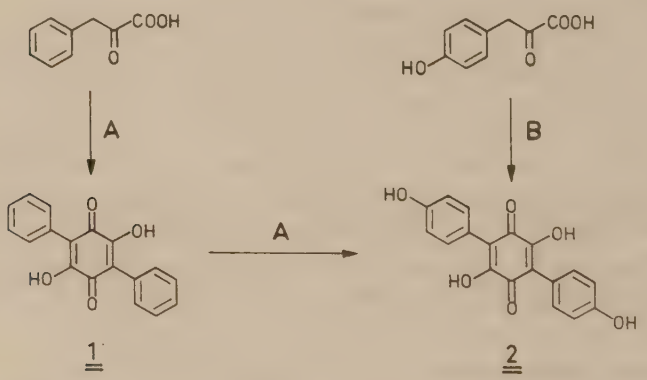
$$= \frac{2.14\cdot 3.63\cdot 100}{531\cdot 10^{3}\cdot 8.48\cdot 10^{-5}} = 17.3\%$$

Mit dieser Einbaurate hätte sich bei der ^{13}C-Verfütterung (Versuch T1) eine Anreicherung von ca. 0.3 Atom-%-Überschuß pro markiertem C-Atom ergeben sollen. Dieser Wert liegt aber außerhalb der Nachweisgrenzen der bei der Gehaltsbestimmung angewandten Analysenmethoden. D.h.: Wahrscheinlich war bei Versuch T1, trotz einer guten Einbaurate, die zu starke Verdünnung von markierter durch im Pilz bereits vorhandene nichtmarkierte Polyporsäure, die Ursache für das gefundene negative Ergebnis.

Eine Wiederholung des ^{13}C-Verfütterungsversuches unter geeigneteren Bedingungen (sehr kleiner Fruchtkörper, Zugabe des Vorläufers in kleinen Portionen an aufeinanderfolgenden Tagen) sollte aber einen nachweisbaren Einbau liefern. Bisher konnte ein solcher Versuch nicht durchgeführt werden.

3.2.2. Biogenese von Atromentin in *Paxillus atrotomentosus*

Für die Biogenese des Atromentins (2) sind, bezüglich der Hydroxylierung der aromatischen Ringe, grundsätzlich zwei Wege denkbar (Schema 9):



Schema 9. Mögliche Wege zur Atromentinbiogenese

Bei Weg A wird aus (aktivierter) Phenylbrenztraubensäure zunächst Polyporsäure (1) gebildet, die dann durch enzymatische Hydroxylierung in Atromentin (2) überführt wird. Weg B entspricht dem Vorschlag von READ und VINING [18] und geht von 4-Hydroxyphenylbrenztraubensäure aus, die direkt zu 2 kondensiert wird.

Ein Argument dafür, daß die Biogenese nicht über Weg A verläuft, ist die Tatsache, daß bisher noch kein Terphenylchinon isoliert wurde, bei dem nur einer der aromatischen Ringe hydroxyliert ist. Ein solches Terphenylchinon muß aber als Zwischenprodukt bei Weg A auftreten.

Zur Klärung der Frage, auf welcher Stufe die Hydroxylierung stattfindet, wurden DL-[3'-^{13}C]Phenylalanin (31*) (Versuch T3) und DL-[3'-^{13}C]Tyrosin (33*) (Versuch T4) an Fruchtkörper von *Paxillus atrotomentosus* (Batsch)Fr. verfüttert (Einzelheiten zur Verfütterung siehe Exp.Teil).

Der auf Baumstümpfen wachsende und durch seine samtartige Stielbasis leicht zu erkennende Fruchtkörper von *P. atrotomentosus* (Samtfußkrempling) enthält bis zu 3.6% (bez. auf Trockenmasse) Atromentin (2) [6] bzw. die entsprechende Leukoverbindung (Hydrochinon). In Mycelkulturen liefert der Pilz kein 2, sondern dessen Oxidationsprodukt, die Atromentinsäure (16) [48].

Während ein Einbau von Phenylalanin nicht nachweisbar war, wurde bei der Tyrosin-Impfung eine deutliche Erhöhung des natürlichen ^{13}C-Gehaltes in 2 festgestellt.
Abb. 1 zeigt die ^{13}C-NMR-Spektren von natürlichem Atromentin (Spektrum A), Atromentin der ^{13}C-Phenylalanin-Impfung (Spektrum B) und Atromentin aus der ^{13}C-Tyrosin-Impfung (Spektrum C).
Die Markierung im Atromentin aus dem Tyrosin-geimpften Pilz befindet sich, wie erwartet, am C-3-Atom (Abb.1, Spektrum C). Das Integral des C-3-Signals ist ca. 2.6mal höher als in der nichtmarkierten Verbindung (Tabelle 1).
Die Erhöhung des Integrals entspricht einem ^{13}C-Gehalt von 2.55 ·1.1= 2.8 Atom-% (= 1.7 Atom-%-Überschuß) pro markiertem C-Atom, bzw. einer Isotopenverdünnung von (90-1.1)/(2.8-1.1)= 52.

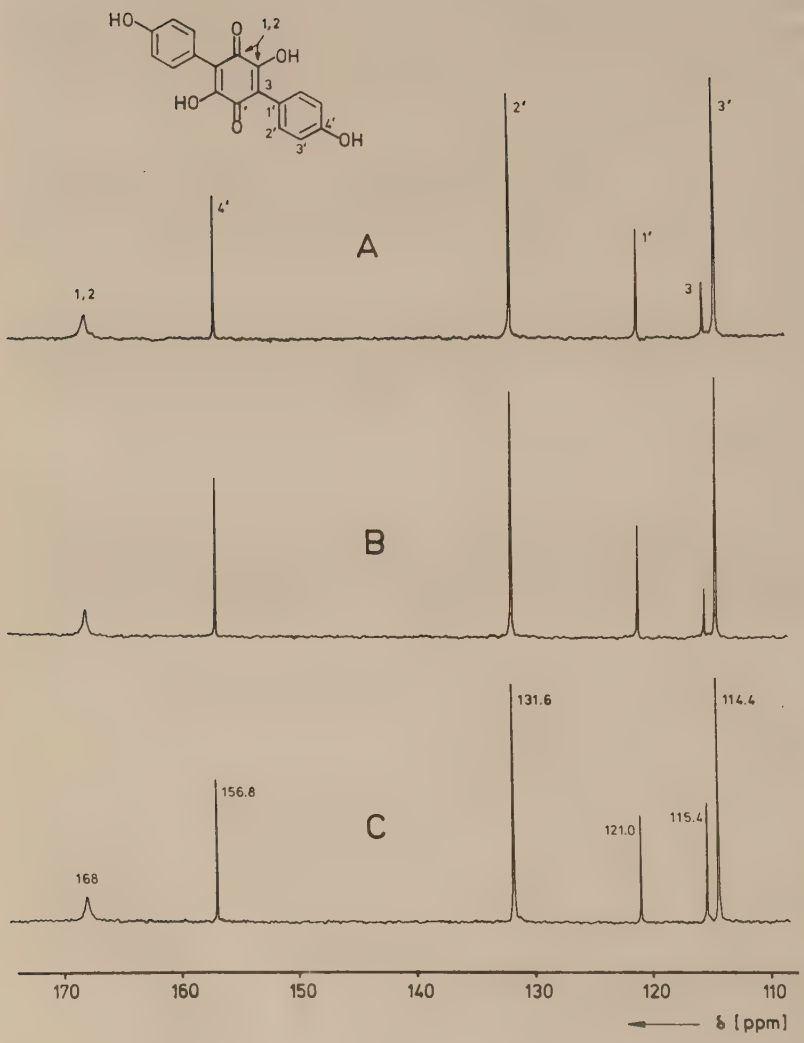


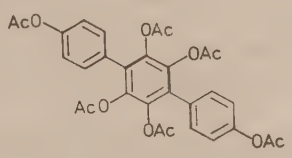
Abb.1. ^{13}C-NMR-Spektrum von A) natürlichem Atromentin, B) Atromentin aus der ^{13}C-Phenylalanin-Impfung (Versuch T3) und C) Atromentin aus der ^{13}C-Tyrosin-Impfung (Versuch T4). Alle Spektren in [D_6]DMSO (20 mg/1.5 ml).

Tabelle 1. Quotient der Integrale entsprechender Signale in den Spektren A, B und C

Chemische Verschiebung (ppm)	Zuordnung	Quotient der Integrale [a] B/A	C/A
114.4	C-3'	0.98	0.99
115.4	C-3	0.96	2.55
121.0	C-1'	0.97	0.85
131.6	C-2'	1.02	1.01
156.8	C-4'	1.05	1.00
168	C-1,2	1.0	1.1

[a] Der Quotient wurde nach vorangegangener Normierung der Spektren auf (Integral C-2' + Integral C-3')/2 = 1 bestimmt.

Zusätzliche Information wurde aus dem Massenspektrum des Hexaleukoacetats 34 erhalten. Hier zeigte sich, daß 3.7 Mol-% der Moleküle einfach und 0.6% doppelt markiert sind. Damit ergibt sich ein durchschnittlicher ^{13}C-Gehalt von 2.5 Atom-% (1.4 Atom-%-Überschuß) pro markiertem C-Atom, der gut mit dem aus dem ^{13}C-NMR bestimmten Wert übereinstimmt.



34

Da ausschließlich Tyrosin und kein Phenylalanin in 2 eingebaut wurde, kann man schließen, daß die Biogenese wie vermutet über Weg B verläuft. Bei einem alleinigen Einbau von Phenylalanin hätte man nicht zwischen Weg A und B unterscheiden können.

Daß Grevillin A (10), welches mit Atromentin (2) isomer ist, als unmittelbarer Vorläufer von 2 auftritt, scheint nicht wahrscheinlich zu sein. Bei einem im Labor durchgeführten Versuch,

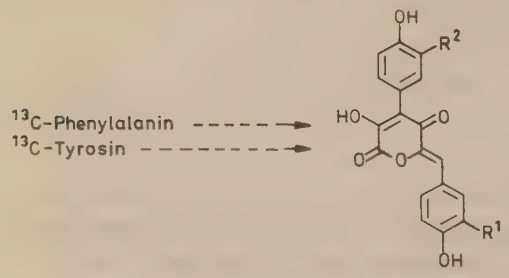
bei dem ^{13}C-Grevillin A 10* an im Mixer zerkleinertes Pilzmaterial von *P.atrotomentosus* verfüttert wurde, konnte kein Einbau von 2 festgestellt werden. Zur Sicherstellung dieses Ergebnisses müßte allerdings die Verfütterung an einem Fruchtkörper wiederholt werden.

3.3. Biogeneseuntersuchungen an Grevillinen

3.3.1. Biogenese von Grevillin A, B und C in *Suillus grevillei*

Wie schon im Allgemeinen Teil formuliert, ist die Biogenese des Grevillingerüstes durch Lactonisierung des bei der Kondensation von zwei Phenylbrenztraubensäureeinheiten entstandenen, enolisierten Zwischenproduktes IIb denkbar (s.Schema 2, Seite 10).

Um zu überprüfen, ob überhaupt Phenylpropaneinheiten in Grevilline eingebaut werden bzw. ob ein Einbau nachweisbar ist, wurden DL-[3'-^{13}C]Phenylalanin (31*) und DL-[3'-^{13}C]Tyrosin (33*) an Fruchtkörper des in Lärchenwäldern wachsenden Goldröhrlings *Suillus grevillei* (Klotzsch) Sing. verfüttert. Im Goldröhrling werden die Grevilline A (10), B (11) und C (12) gebildet.



	R^1	R^2
10	H	H
11	OH	H
12	OH	OH

^{13}C-Phenylalanin 31* wurde als wäßrige Lösung mit einer Spritze und mit Hilfe eines Glastubus appliziert (Versuch G1, Verfütterungsdaten siehe Exp.Teil). Es konnte aber kein Einbau in die Grevilline nachgewiesen werden.

Einen guten Einbau erhielt man bei Verfütterung von ^{13}C-Tyrosin 33* (Versuch G2), obwohl die Pilze nach der Applikation des Tyrosins (mit Spritze als wäßrige Suspension) das Wachstum einstellten und eingingen.

Die in den Grevillinen A (10) und B (11) bei Verfütterung von 33* gefundenen ^{13}C-Anreicherungen wurden massenspektrometrisch bestimmt und sind in Tabelle 2 angegeben.

Tabelle 2. Durchschnittliche Anreicherung (Atom-%-Überschuß) pro markiertem C-Atom in Grevillinen aus Versuch G2. Werte in Klammern: Anteile von einfach- und doppeltmarkierten Molekülen (Mol-%).

Versuch	verfütterter Vorläufer	^{13}C-Anreicherung Atom-%-Überschuß bzw. (Mol-%) Grevillin A (10)	Grevillin B (11)
G2	^{13}C-Tyrosin 33*	12.8 (15.0 u. 6.4 [a])	9.6 (8.9 u. 6.2 [a])

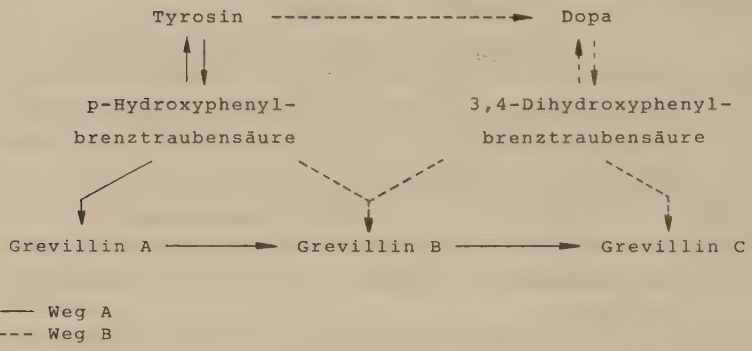
[a] Wegen unterschiedlich starker (M+2H)-Ionen bei den Messungen Fehler von $\pm$ 2%.

Von Grevillin C (12) konnte wegen des nur in Spuren vorhandenen und verunreinigten Materials kein MS erhalten werden.

Der nachgewiesene Einbau von Tyrosin zeigt deutlich, daß p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure und nicht Phenylbrenztraubensäure bei der Biogenese der Grevilline als Vorläufer auftritt. Dies steht im Einklang mit dem schon bei Atromentin gefundenen Ergebnis und ist ein Hinweis für die postulierte gemeinsame Zwischenstufe bei der Atromentin- und Grevillinbiogenese (II, s. Schema 1 und 2).

Bisher konnte noch keine Aussage darüber gemacht werden, auf welcher Stufe die zusätzliche Hydroxylierung bei der Biogenese von Grevillin B (11) und C (12) stattfindet. Denkbar wäre, daß

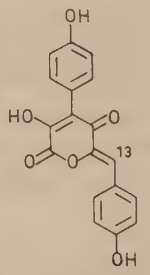
zunächst Grevillin A (10) entsteht, welches anschließend sukzessive hydroxyliert wird (Schema 10, Weg A) oder daß die Hydroxylierung schon vor der Kondensation der Phenylpropaneinheiten erfolgt (Schema 10, Weg B). Für die letzte der genannten Möglichkeiten spricht das Vorkommen von L-Dopa in einigen Pilzen [62].



Schema 10. Mögliche Wege zur Biogenese von Grevillin B und C

Zur Klärung der Frage des Hydroxylierungszeitpunktes wurde ^{13}C-Grevillin A 10*, das die Markierung am Methinkohlenstoff der Benzylidengruppierung trägt, unter verschiedenen Bedingungen an Fruchtkörper von *S.grevillei* verfüttert (Versuche G3-G5, Verfütterungsdaten siehe Exp.Teil).

10*



Die in den isolierten Grevillinen gefundenen Anreicherungen wurden massenspektrometrisch bestimmt und sind in Tabelle 3 angegeben. Aus den Ergebnissen kann geschlossen werden, daß die Bioge-

nese der Grevilline B und C über Weg A verläuft.

Tabelle 3. ^{13}C-Anreicherung des markierten C-Atoms in Grevillinen aus *S.grevillei* bei Verfütterung von ^{13}C-Grevillin A

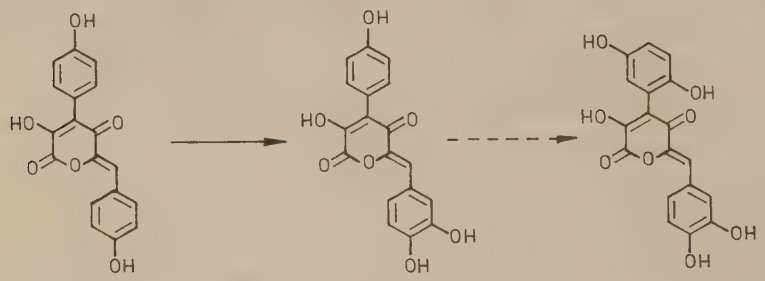
Versuch	Art der Applikation	^{13}C-Anreicherung (Atom-%-Überschuß) in den isolierten Grevillinen		
		A (10)	B (11)	C (12)
G3	wäßrige Suspension/ Spritze	-	0	0
G4	wäßrige Lösung/ Glastubus	86.5	3.8	0
G5	Lösung in DMSO/ Spritze	87.5	29.4	- [a]

[a] Von dem nur in Spuren vorhandenen und verunreinigten Material konnte kein Spektrum erhalten werden.

Wie ersichtlich, ist die Art der Applikation entscheidend darüber, ob der Vorläufer eingebaut wird oder nicht. Eine sehr hohe Anreicherung in Grevillin B (11) wurde bei Verfütterung von in DMSO gelöstem 10* beobachtet (Versuch G5). Dies mag damit zusammenhängen, daß Permeabilitätsprobleme beim Transport des Vorläufers an den Wirkort durch Verwendung von DMSO als Lösungsmittel überwunden wurden (vgl. Lit. [57]). Daß erst eine durch DMSO bewirkte Umlenkung des Metabolismus für den Einbau verantwortlich ist, scheint nicht wahrscheinlich zu sein, da in Wasser gelöstes ^{13}C-Grevillin A - wenn auch wesentlich schlechter - ebenfalls eingebaut wurde (Versuch G4).

3.3.2. Biogenese von Grevillin D in *Suillus granulatus* und *Suillus luteus*

Im vorhergehenden Verfütterungsexperiment wurde gezeigt, daß Grevillin A (10) zu Grevillin B (11) metabolisiert wird. Wenn nun 11 tatsächlich ein Vorläufer von Grevillin D (13) ist (siehe Allgem.Teil, Schema 3), so sollte markiertes Grevillin A 10* auch in Grevillin D eingebaut werden.



10 11 13

Um dies zu überprüfen, wurde ^{13}C-Grevillin A 10* an die Grevillin D produzierenden Pilze *Suillus granulatus* (L.ex Fr.)O.Kuntze (Körnchenröhrling, Versuch G6) und *Suillus luteus* (L.ex Fr.)S.F. Gray (Butterpilz, Versuch G7) verfüttert.

Während in Grevillin D aus *S.granulatus* kein Einbau nachzuweisen war, konnte in dem aus *S.luteus* isolierten Farbstoff eine ^{13}C-Anreicherung von 2.5 Atom-%-Überschuß bestimmt werden. Die Bestimmung erfolgte massenspektrometrisch am ($M-H_2O$)-Peak.

Das negative Ergebnis bei Versuch G6 dürfte allerdings ebenso wie bei Versuch G3 (siehe Kap. 3.3.1.) auf die Art der Applikation zurückzuführen sein. Bei beiden Versuchen wurde eine wäßrige Suspension von 10* geimpft. An *Suillus luteus* (Versuch G7) wurde eine wäßrige Lösung verfüttert.

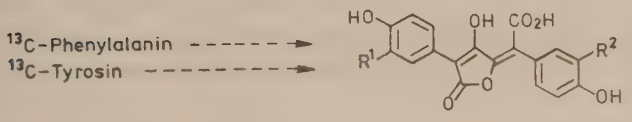
Der gefundene Einbau ist ein erster Hinweis dafür, daß der von STEGLICH [4,23b] gemachte Vorschlag zur Biogenese von Grevillin D (13) tatsächlich zutrifft. Um auch den postulierten Mechanismus bestätigen zu können, ist allerdings ein weiteres Experiment

notwendig: Ein Vorläufer, der im sich umlagernden aromatischen Ring spezifisch markiert ist, muß an einen geeigneten Pilz verfüttert und das daraus isolierte 13 ^{13}C-NMR-spektroskopisch untersucht werden.

3.4. Biogeneseuntersuchungen an Hydroxypulvinsäuren

3.4.1. Biogenese von Xerocomsäure und Variegatsäure in *Boletus erythropus* und *Boletinus cavipes*

Als mögliche Vorläufer der Pulvinsäuren in Pilzen kommen, wie bei den Terphenylchinonen und Grevillinen, die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin in Frage. Um zu sehen, ob ein Einbau von ^{13}C-markierten Aminosäuren in Xerocomsäure (17) und Variegatsäure (18) nachweisbar ist, wurden an den Flockenstieligen Hexenröhrling (*Boletus erythropus* Fr.) DL-[3'-^{13}C-Phenylalanin (31*) (Versuche P1 und P2) und an den Hohlfußröhrling [*Boletinus cavipes* (Opat.)Kalchbr.] DL-[3'-^{13}C]Tyrosin (33*) (Versuch P3) verfüttert [+] und die erhaltenen Pulvinsäuren massenspektrometrisch untersucht.



	R^1	R^2
16	H	H
17	OH	H
18	OH	OH

Für Verfütterungsexperimente sind *B.erythropus* und *B.cavipes* besonders gut geeignet. Ein einziger Fruchtkörper von *B.erythropus* enthält bis zu 100 mg an leicht isolierbarer Variegatsäure (18). Außerdem läßt sich der Pilz, auch mit großen Flüssigkeitsvolumina, gut impfen. Ebenfalls gut geeignet für die Aufnahme von großen Flüssigkeitsvolumina ist der hohle Stiel von *B.cavipes*.

[+] Ein mit 40 mg DL-[3'-^{13}C]Tyrosin geimpfter *B.erythropus* wurde, trotz Hinweis auf das Experiment, wahrscheinlich von Pilzsammlern geerntet und mitgenommen.

Während bei den Experimenten mit ^{13}C-Phenylalanin kein Einbau in Variegatsäure (18) nachgewiesen werden konnte, wurde bei der Verfütterung von ^{13}C-Tyrosin an *B.cavipes* eine deutliche Erhöhung des natürlichen ^{13}C-Gehalts in der isolierten Xerocomsäure (17) und Variegatsäure (18) festgestellt. Die Bestimmung der Anreicherung (in Atom-%-Überschuß) erfolgte durch Vergleichsmessungen an den (M^+-H_2O)-Peaks der Pulvinsäuren. Die gefundenen Werte sind in Tabelle 4 angegeben.

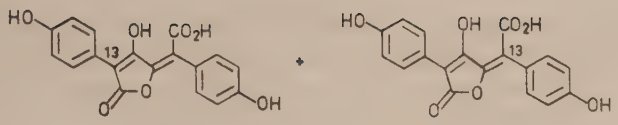
Tabelle 4. Durchschnittliche Anreicherung (Atom-%-Überschuß) pro markiertem C-Atom in Hydroxypulvinsäuren aus Versuch P3 und P4. Werte in Klammern: Anteile von einfach- und doppelt-markierten Molekülen (Mol-%).

			^{13}C-Anreicherung Atom-%-Überschuß bzw. (Mol-%)		
Versuch	Pilz	verfütterter Vorläufer	Atromentinsäure	Xerocomsäure	Variegatsäure
P3	*Boletinus cavipes*	^{13}C-Tyrosin	-	6.7 (8.3 u. 3.6)	2.3 (6.2 u.0.3[a])
P4	*Boletus erythropus*	^{13}C-Atromentinsäure	84	43.6	9.6

[a] Dieser Wert liegt außerhalb der Nachweisgrenze.

Daß nicht Phenylalanin, sondern Tyrosin eingebaut wird, war nach den Ergebnissen der Atromentin- und Grevillin-Biogenese zu erwarten.

Auf welcher Stufe die zusätzliche Hydroxylierung stattfindet, die zur Bildung von Xerocomsäure (17) und Variegatsäure (18) führt, zeigt das Ergebnis eines Versuchs, bei dem ^{13}C-Atromentinsäure 16* (90 Atom%) an einen Fruchtkörper von *B.erythropus* verfüttert wurde (Versuch P4).



16 *(1:1 Gemisch)

Die hierbei gefundene sehr hohe Anreicherung des ^{13}C-Gehaltes in den isolierten Hydroxypulvinsäuren (s. Tabelle 4) ist ein klarer Hinweis dafür, daß bei der Biogenese zunächst Atromentinsäure entsteht, welche anschließend sukzessive zu **17** und **18** hydroxyliert wird.

Die beiden anderen Möglichkeiten, Hydroxylierung auf der Stufe des Phenylpropans oder des Terphenylchinons, sind nach dem vorliegenden Resultat nicht wahrscheinlich, müßten aber noch durch Kontrollexperimente ausgeschlossen werden.

Abb.2 zeigt das ^{13}C-NMR-Spektrum von Variegatsäure (**18**), aus dem mit **16*** geimpften *B.erythropus* (Spektrum B) und ein Spektrum von **18** mit natürlichem ^{13}C-Gehalt (Spektrum A). Deutlich erkennt man die Signale der angereicherten C-Atome bei δ= 104.9 und δ= 117.2. Die aus dem ^{13}C-NMR-Spektrum erhaltene Anreicherung [+)] von 9.2 (Atom-%-Überschuß) pro markiertem C-Atom stimmt mit dem massenspektrometrisch (am M^+-H_2O)-Peak bestimmten Wert von 9.6 gut überein.

+) Die ^{13}C-Anreicherung wurde nach Normierung der Spektren auf die H- und OH-tragenden aromatischen C-Atome wie folgt berechnet:

$$\text{Atom-\%-Überschuß} = \frac{I_1^A + I_2^A}{I_1^B + I_2^B} \cdot 1.1 - 1.1$$

I_1^A, I_2^A = Integrale der Signale bei 104.9 und 117.2 im Spektrum A.
I_1^B, I_2^B = Integrale der Signale bei 104.9 und 117.2 im Spektrum B.

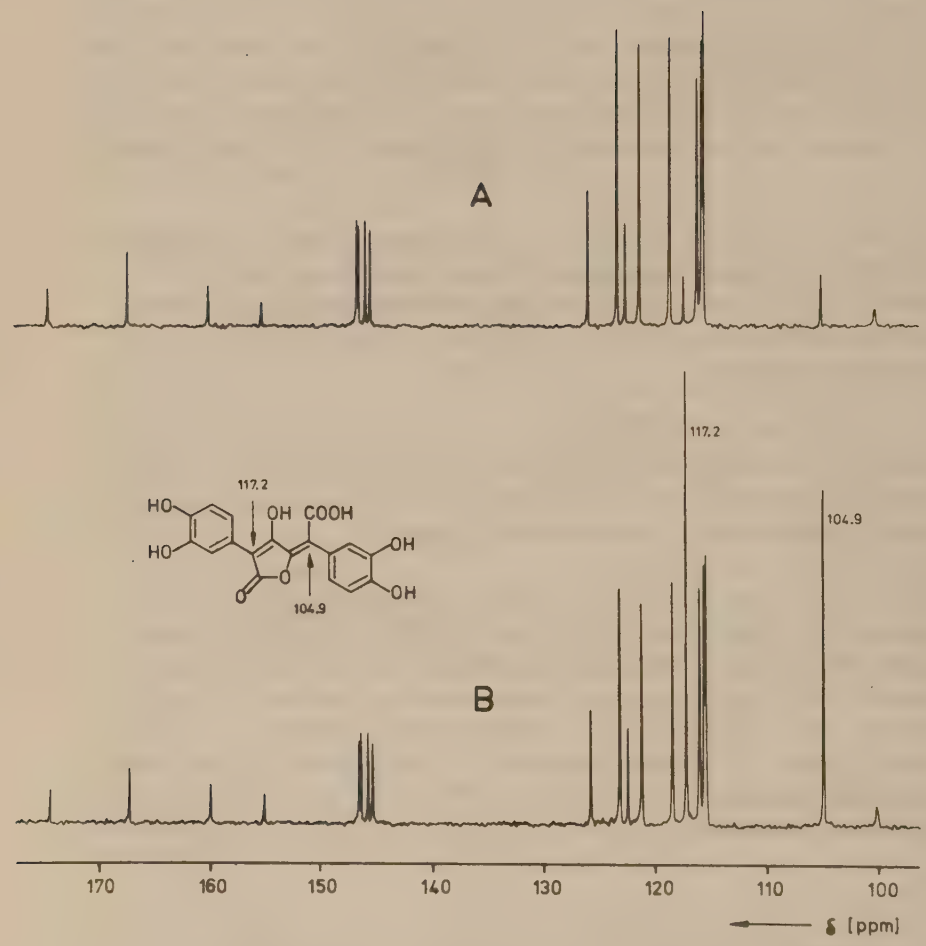


Abb.2. ^{13}C-NMR-Spektren von A) natürlicher Variegatsäure und B) Variegatsäure aus der ^{13}C-Atromentinsäureimpfung (Versuch P4).
Die Aufnahme der Spektren erfolgte in [D_6]Aceton/[D_4]-Methanol = 8:1 (60 mg/1.3 ml).

3.4.2. Biogenese von Hydroxypulvinsäuren in Mycelkulturen von *Serpula lacrymans* +)

Schon 1973 wurde von BRESINSKY [63] auf die Möglichkeit hingewiesen, an Mycelkulturen des Hausschwammes, *Serpula lacrymans* (Wulf. ex Fr.)Bond. (Coniaphoraceae), die Biogenese von Pulvinsäurederivaten zu untersuchen. In *S.lacrymans* werden Atromentinsäure (16), Xerocomsäure (17), Variegatsäure (18) und Variegatorubin (20) gebildet [63].

- Verfütterung von ^{13}C-Grevillin A 10* (Versuch P5)

In den isolierten Hydroxypulvinsäuren 17 und 18 aus einer mit 10* geimpften Mycelkultur von *S.lacrymans* konnten keine Anzeichen eines Einbaus festgestellt werden. Dieses Ergebnis deckt sich mit der bei der Verfütterung von 10* an *P.atrotomentosus* (s.Kap.3.2.2., S.26) gemachten Beobachtung und schließt Grevillin A (10) als möglichen Vorläufer von Atromentin (2) und somit auch der Hydroxypulvinsäuren aus.

Im MS der "Atromentinsäure" aus Versuch P5 wird statt der erwarteten Signale ein Peak bei m/e= 382 beobachtet. Hierbei könnte es sich um den ($M-H_2O$)-Peak einer Dimethyl-variegatsäure 35, mit den gleichen Laufeigenschaften wie 16 handeln. Das entsprechende Signal einer Monomethyl-variegatsäure 36 tritt als Verunreinigung im Spektrum von 17 aus Versuch P5 auf.

Methylierte Variegatsäurederivate wurden kürzlich auch aus Kulturen von *Hygrophoropsis aurantiaca* isoliert [64].

+) Die Verfütterungen der ^{13}C-markierten Verbindungen an Mycelkulturen wurden von H.BESL und A.BRESINSKY am Botanischen Institut der Universität Regensburg durchgeführt.

- Verfütterung von DL-[3'-^{13}C]Tyrosin 33* (Versuch P6)

Tyrosin wird in Mycelkulturen von *S.lacrymans* gut in Hydroxypulvinsäuren eingebaut. Die bei Versuch P6 gefundenen Anreicherungen sind in Tabelle 5 zusammengestellt:

Tabelle 5. Durchschnittliche Anreicherung (Atom-%-Überschuß) pro markiertem C-Atom in Hydroxypulvinsäuren aus Versuch P6. Werte in Klammern: Anteile von einfach- und doppelt-markierten Molekülen (Mol-%).

isolierte Hydroxy-pulvinsäure	^{13}C-Anreicherung Atom-%-Überschuß	Mol-%
Xerocomsäure (17)	12.6	(14.0 und 6.7)
Variegatsäure (18)	3.7	(6.6 und 1.5)
"Dimethyl-variegatsäure" 35 [a)]	9.3	(13.0 und 3.9)
"Monomethyl-variegatsäure" 36 [a)]	8.2	(11.6 und 3.5)

a) Die Bestimmung der Anreicherung erfolgte mit Vergleichsspektren aus Versuch P5.

Wenn es sich bei den "Verunreinigungen" 35 und 36 tatsächlich um methylierte Variegatsäure handelt, dann ist der beobachtete Einbau von Tyrosin ein Hinweis dafür, daß Methyl-Hydroxypulvinsäuren zumindest bei *S.lacrymans* nicht aus Bruchstücken des Ligninabbaus [64)], sondern direkt durch Methylierung bzw. Methylierung von Vorläufern gebildet werden.

Dafür, daß die Methylierung schon auf einer Vorstufe stattfindet, spricht die gegenüber 18 gefundene höhere Anreicherung in 35 und 36, die so interpretiert werden kann, daß methylierte Vorläufer besser in Richtung "Variegatsäure" metabolisiert werden können als nichtmethylierte.

In diesem Zusammenhang ist interessant, daß aus *S.lacrymans* ein methyliertes Isoxerocomorubin isoliert werden konnte, auf das

in Kap.4.6. noch näher eingegangen wird.

Wie die Biogenese der methylierten Hydroxypulvinsäuren im einzelnen verläuft, kann erst nach weiteren Experimenten geklärt werden.

3.4.3. Biogenese von Variegatsäuremethylester und Variegatorubin in Mycelkulturen von *Hygrophoropsis aurantiaca*

An Mycelkulturen des Falschen Pfifferlings, *Hygrophoropsis aurantiaca* (Wulf ex.Fr.)R.Mre. [65] wurde bei Versuch P7 DL[3'-^{13}C]-Phenylalanin (31*) und bei Versuch P8 ^{13}C-Grevillin A 10* verfüttert. Nach neunwöchiger Kulturdauer wurde bei Versuch P7 Variegatsäuremethylester (37) [66] und bei Versuch P8 Variegatorubin (20) isoliert.

Weder in 35 noch in 20 konnte bei der massenspektrometrischen Gehaltsbestimmung ein Anzeichen für eine ^{13}C-Anreicherung gefunden werden.

Dieses Ergebnis steht im Einklang mit dem vorhergehenden Versuch und dem an *B.erythropus* durchgeführten Verfütterungsexperiment (Versuche P1 und P2).

3.5. Zusammenfassung zu den Biogeneseuntersuchungen

Die bei den Untersuchungen erhaltenen Ergebnisse zeigen, daß es unter Beachtung einiger Bedingungen möglich ist, erfolgreich Biogenesestudien durch Verfütterung ^{13}C-markierter Vorläufer an freiwachsende Fruchtkörper von Pilzen durchzuführen. Gegenüber Verfütterungen an Mycelkulturen ergeben sich dabei keine Nachteile. Die Bedingungen sind:

- Der Vorläufer muß in einer geeigneten Form, portionsweise über die Dauer des Pilzwachstums verfüttert werden.
- Die Menge des im Pilz vorhandenen Metaboliten darf, wegen der sonst auftretenden starken Verdünnung von markiertem durch nichtmarkiertes Material, nicht zu groß sein.

Tabelle 6. Zusammenfassung der Biogeneseuntersuchungen (+= Einbau, -= kein Einbau konnte nachgewiesen werden)

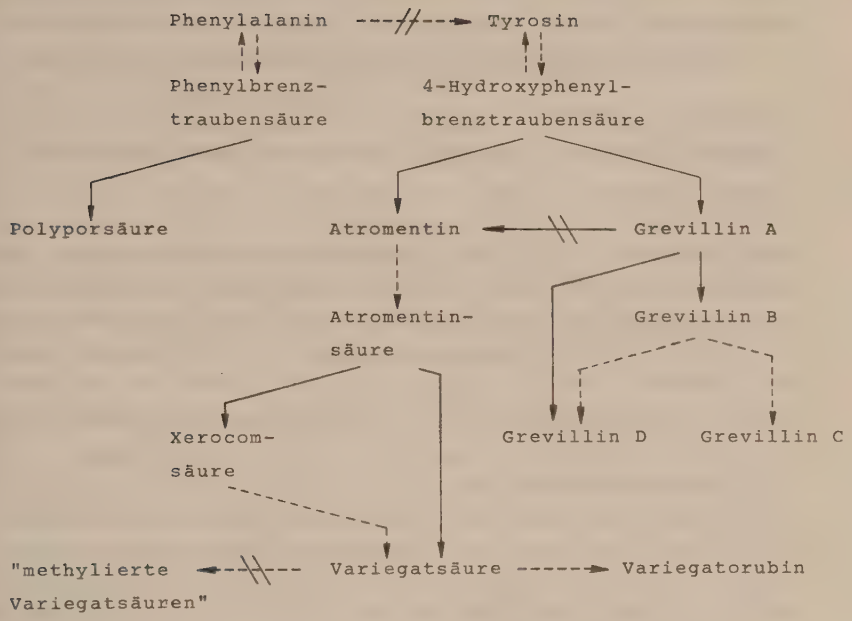
	verfütterter ^{13}C-markierter Vorläufer			
Pilzfarbstoff	Phenylalanin 31*	Tyrosin 33*	Grevillin A 10*	Atromentinsäure 16*
Polyporsäure	+ [a]			
Atromentin	-	+	-	
Grevillin A	-	+		
Grevillin B	-	+	+	
Grevillin C	-	- [b]	- [b]	
Grevillin D			+	
Xerocomsäure		+	-	+
Variegatsäure	-	+	-	+
Variegatorubin			-	
Variegatsäure-methylester	-			
"methylierte Variegatsäure"		+	-	

[a] Einbau nur bei Verfütterung von ^{14}C-Phenylalanin nachweisbar.

[b] Wegen nur in Spuren vorhandenem und verunreinigtem Material kein Nachweis möglich.

Welcher verfütterter Vorläufer bei den durchgeführten Experimenten in welchen Pilzfarbstoff eingebaut wurde, kann aus Tabelle 6 entnommen werden.

Damit ergibt sich für die Biogenese der in Schema 11 dargestellte Verlauf.



Schema 11. Biogenese der untersuchten Pilzfarbstoffe (⟶ = Biogenese nachgewiesen; ⟶ = Biogenese vermutet)

Aus der Tatsache, daß in keinem Experiment der Einbau von Phenylalanin in einen hydroxylierten Phenylpropan-Pilzfarbstoff nachgewiesen werden konnte, kann man folgern, daß bei den untersuchten Pilzen die Umwandlung von Phenylalanin in Tyrosin keine Rolle spielt. D.h. Tyrosin bzw. 4-Hydroxyphenylbrenztraubensäure wird direkt aus Prephensäure gebildet. Dies steht im Einklang mit Beobachtungen die zeigen, daß die Umwandlung zwar öfter in höheren Organismen auftritt, aber in Mikroorganismen nicht verbreitet ist [67].

Zur Biogenese der einzelnen Farbstoffklassen läßt sich noch folgendes sagen:

- Terphenylchinone

Die Terphenylchinone Polyporsäure und Atromentin sind biogenetisch nur weitläufig über die gemeinsame Vorstufe Prephensäure

verwandt. Das heißt auch: Zwischen Polyporsäure- und Atromentin-produzierenden Pilzen bestehen von chemotaxonomischen Gesichtspunkten her keine engeren verwandtschaftlichen Beziehungen.

Die chemisch einfach durchzuführende Umlagerung der Grevilline in Terphenylchinone wird bei der Biogenese nicht beobachtet.

- Grevilline

Grevilline entstehen aus 4-Hydroxyphenylbrenztraubensäure; wahrscheinlich über das gleiche Zwischenprodukt wie Atromentin. Das bei der Biogenese zuerst gebildete Grevillin A wird sukzessive zu Grevillin B und C hydroxyliert. Als Vorläufer von Grevillin D tritt ebenfalls Grevillin A auf, was ein Hinweis für die Richtigkeit des von STEGLICH [4,23b)] vorgeschlagenen Mechanismus ist.

- Hydroxypulvinsäuren

In Hydroxypulvinsäuren wird Tyrosin bzw. 4-Hydroxyphenylbrenztraubensäure eingebaut. Die Biogenese verläuft wahrscheinlich über eine oxidative Ringspaltung von Atromentin bzw. Leukoatromentin. Die dabei gebildete Atromentinsäure wird zu Xerocomsäure und Variegatsäure hydroxyliert.

"Methylierte Variegatsäuren" in *S. lacrymans* entstehen nicht aus Ligninbruchstücken, sondern wahrscheinlich aus methylierten Vorstufen der Variegatsäurebiogenese.

Grevilline und auch Phenylalanin kommen als Vorläufer der Hydroxypulvinsäuren nicht in Frage.

4. Strukturaufklärungen

4.1. Orange-1 aus Fruchtkörpern von *Paxillus panuoides* und *Paxillus atrotomentosus*

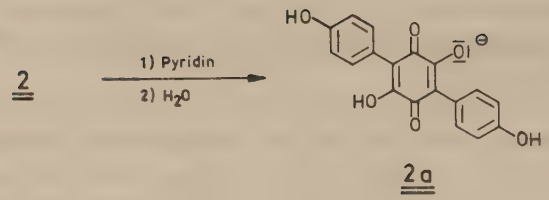
Paxillus panuoides Fr. und *P.atrotomentosus* (Batsch)Fr. sind holzzerstörende Pilze, die bevorzugt auf Nadelholzstümpfen wachsen und chemotaxonomisch eng miteinander verwandt sind. In Fruchtkörpern beider Pilze wird Atromentin (2) [8,48b], in Mycelkulturen Atromentinsäure (16) und Xerocomsäure (17) [5e,48] gebildet. Außerdem wurde noch eine Reihe weiterer, teilweise noch nicht identifizierter Pigmente in den Pilzen nachgewiesen [5e,48].

Ein in beiden Pilzen auftretendes orangerotes Pigment 38, das Orange-1 genannt wurde, konnte von BESL und BRESINSKY [68] aus tiefgefrorenen Fruchtkörpern des Bauholzschädlings *P.panuoides* und aus getrockneten Fruchtkörpern von *P.atrotomentosus* isoliert werden. In den Pilzen scheint das Pigment teilweise als farblose "Leukoverbindung" vorzuliegen, die erst beim Aufarbeiten zu 38 oxidiert wird. Für die Strukturaufklärung, die im folgenden beschrieben wird, standen uns aus *P.panuoides* 7 mg und aus *P.atrotomentosus* 4 mg Rohpigment zur Verfügung.

Orange-1 (38) kann chromatographisch gut an Polyamid AC/Aceton gereinigt werden. Bei Reinigungsversuchen an Sephadex LH 20/Methanol wurde teilweise Zersetzung des Pigmentes beobachtet.

38 ist löslich in Aceton, Methanol und Essigester und gibt im DC (Laufmittel: Benzol/Ameisensäureethylester/Ameisensäure = 10:5:3) bei R_F= 0.48 einen orangefarbigen Fleck, der sich beim Behandeln mit NH_3-Dämpfen violett verfärbt. Die Farbänderung ist reversibel. Mit HCl-Dämpfen kommt die orange Farbe wieder zurück, woraus geschlossen werden kann, daß 38 acide OH-Gruppen enthält.

Die Farbänderung mit NH_3 erinnert an Polyporsäure (1) [6] oder auch an Atromentin (2), bei dem nach Lösen in Pyridin und Verdünnen mit Wasser die violette Farbe des Monoanions 2a sichtbar wird [4]:



2a

Daß es sich bei 38 um ein Atromentinderivat handeln könnte, ist durch das gleichzeitige Auftreten von Atromentin in den Pilzen und die Tatsache, daß 38 als Leukoverbindung in den Fruchtkörpern vorliegt, sogar ziemlich wahrscheinlich.

Ein weiterer Hinweis hierfür wird aus dem Massenspektrum erhalten. Als Fragmentionen werden Peaks bei m/e= 324 und 296 beobachtet, die den M^+- und $(M-28)^+$-Ionen von Atromentin [61] bzw. dem isomeren Grevillin A (10) [69] entsprechen. Im höheren Massenbereich treten Peakgruppen bei 418/420 und 512/514 auf. Die sich um 2 Masseneinheiten unterscheidenden "Doppelpeaks" sind typisch für Chinone, die von im Einlaßsystem entstandenen Hydrochinonen begleitet werden [61,70].

Die Massendifferenz zwischen 512 ⟶ 418 und 418 ⟶ 324 ist jeweils = 94 ME. Wenn tatsächlich ein Atromentinderivat vorliegt, könnte das bedeuten, daß zwei Reste R mit jeweils 95 ME mit Atromentin verknüpft sind. Dafür spricht auch ein Peak bei m/e= 95 (base peak), für den eine Zusammensetzung $C_6H_7O^+$ (= 3 D.B.Ä.) wahrscheinlich ist.

Beim Behandeln von 38 mit heißer Natronlauge und anschließendem Ansäuern können im DC Atromentin und eine farblose Substanz nachgewiesen werden.

Im IR wird das Vorliegen eines chinoiden Systems durch Banden bei 1650 und 1610 cm^{-1} bestätigt. Eine Bande bei 1730 cm^{-1} ist ein Hinweis dafür, daß die Reste "esterartig" mit Atromentin verknüpft sind.

D.h., bei dem im MS auftretenden Fragment bei m/e= 95 handelt es sich wahrscheinlich um einen Acylrest der Zusammensetzung $C_5H_7CO^+$, wofür auch ein Peak bei m/e= 67 ($C_5H_7^+$) spricht, der durch Abspaltung von CO aus m/e= 95 entstanden sein könnte.

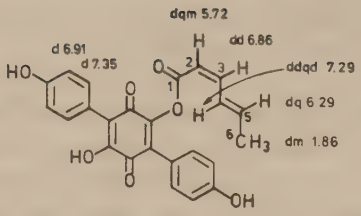
Weitere Informationen über die Art des Acylrestes wurden aus dem ^{1}H-NMR erhalten. Neben einem für ein Atromentinderivat erwarteten AA'BB'-System (8H) bei δ= 6.91 und 7.35 (J= 8.9 Hz) zeigt das Spektrum Signale von vinylischen Protonen (4H!) und das Dublett einer CH_3-Gruppe (J= 6.8 Hz) bei δ= 1.86 (3H!). Vergleicht man die Integrale der Signale, so wird klar, daß nur ein Rest der Zusammensetzung C_5H_7CO an Atromentin gebunden sein kann.

Dieses mit den MS-Daten im Widerspruch stehende Ergebnis läßt sich erklären, wenn man annimmt, daß im Einlaßsystem des Massenspektrometers eine "Disproportionierung" von monosubstituiertem Orange-1 (38) in Atromentin (2) und disubstituiertes Produkt erfolgt, welches die Peaks bei m/e= 512/514 verursacht. Gestützt wird diese Vermutung durch die Beobachtung, daß bei der Schmelzpunktsbestimmung Zersetzung von 38 unter Bildung von 2 und einer gegenüber 38 unpolareren Substanz (disubstituiertes Produkt) eintritt. Daß bei der Massenspektrometrie von 2,5-Dihydroxy-1,4-benzochinonderivaten Spezies mit Molekulargewichten höher als die der Probe auftreten, ist bekannt und wurde intensiv von GRIGSBY et al. [71] untersucht.

Die im ^{1}H-NMR beobachtete Methylgruppe und die vinylischen Protonen lassen darauf schließen, daß es sich bei dem Rest R um einen Sorbinoylrest [CH_3-(CH=CH)$_2$-CO] handelt. Entkopplungsexperimente und Kopplungskonstanten sprechen für eine 2Z,4E-Konfiguration der Doppelbindungen, was durch einen Vergleich der NMR-Daten mit denen eines in der Literatur [72] beschriebenen 2Z,4E-Sorbinsäuremethylesters bestätigt wird.

Daß der Sorbinoylrest über eine Chinon-Hydroxygruppe mit dem Atromentinteil verknüpft ist, folgt aus dem Verhalten von 38 gegenüber NH_3 (violettes Monoanion).

Mit den gefundenen Daten ergibt sich für Orange-1 die Konstitution:



38

J [Hz]	
$J_{2,3}$	= 11.1
$J_{2,5}$	= 0.5
$J_{2,6}$	= 0.7
$J_{3,4}$	= 11.3
$J_{4,5}$	= 14.6
$J_{4,6}$	= 1.5
$J_{5,6}$	= 6.8

Der endgültige Beweis für die vorgeschlagene Konstitution erfolgte durch die Synthese (siehe Kap. 5.2.).

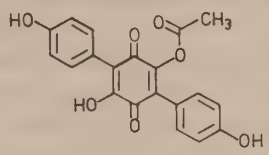
Orange-1 ist die erste bekanntgewordene Verbindung einer Reihe von natürlich vorkommenden monoacylierten Atromentinderivaten. Außerdem dürfte mit 38 zum ersten Mal ein Naturstoff entdeckt worden sein, der einen 2Z,4E-Sorbinsäurerest enthält.

4.2. Orange-2 aus Fruchtkörpern von *Paxillus panuoides* und Kulturen von *Omphalotus olearius*

Ein weiteres orange gefärbtes Pigment, Orange-2 (39), konnte von BESL und BRESINSKY [68] aus Fruchtkörpern von *P.panuoides* und aus Mycelkulturen des Leuchtenden Ölbaumpilzes, *Omphalotus olearius* (DC ex Fr.)Sing.,isoliert werden. *O.olearius*, ein Pilz, der nach chemotaxonomischen Untersuchungen von BRESINSKY und BESL [73] zu den Paxillaceae gerechnet wird, bildet in Mycelkulturen Thelephorsäure (4), Hydroxypulvinsäuren 16-18 und Gyroporin (27) [73].

39 hat einen etwas niedrigeren R_F-Wert (0.32) als Orange-1 (38) und zeigt mit NH_3-Dämpfen die gleiche violette Verfärbung. Dieses Verhalten läßt auf ein monoacyliertes Atromentinderivat schließen. Wie erwartet,treten im MS die typischen Atromentinpeaks bei m/e= 324 und 296 auf. Als Molekülion kommen Peaks bei m/e= 366 und 408

in Frage. Die schon bei 38 beschriebene "Disproportionierung" von monoacylierten Atromentinderivaten macht für 39 eine Molekularmasse von 366 wahrscheinlicher. Die Abspaltung von Keten (M^+-42) aus dem Molekülion und ein Peak bei m/e= 43 sind sichere Anzeichen dafür, daß es sich bei Orange-2 (39) um ein monoacetyliertes Atromentin handelt:



39

Durch weitere spektroskopische Daten (IR und ^{1}H-NMR) und durch eine Synthese wird die aus dem MS abgeleitete Konstitution bestätigt.

Interessant ist, daß die unsymmetrisch aufgebaute Verbindung 39 im Aromatenbereich des ^{1}H-NMR nur ein AA'BB'-System (δ= 6.92, 7.35, J= 8.9 Hz; 8H) erkennen läßt. Das gleiche Verhalten wurde auch schon bei 38 beobachtet und kann nicht als zufälliges Überlappen der beiden AA'BB'-Systeme von Ring A und B gedeutet werden, sondern ist auf eine echte Äquivalenz der aromatischen Ringe zurückzuführen. Als Ursache hierfür kommen Acylwanderungen in Frage, auf die in Kap.6. näher eingegangen wird.

Das gleichzeitige Auftreten von Orange-2 in *P.panuoides* und *O.olearius* ist eine Bestätigung für die getroffene Einordnung des Ölbaumpilzes zur Familie der Paxillaceae.

Weiteren chemotaxonomischen Untersuchungen bleibt es vorbehalten zu klären, ob monoacylierte Atromentinderivate typische Pigmente für bestimmte Pilze näheren Verwandtschaftsgrades sind.

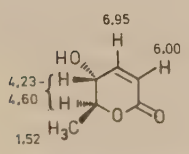
4.3. Orange-3 aus Fruchtkörpern von *Paxillus panuoides*

Für die Konstitution eines aus *P.panuoides* isolierten, instabilen, im DC unterhalb von Orange-2 (39) laufenden Pigmentes Orange-3 (40) können bisher nur erste Hinweise gegeben werden. Die Instabilität und geringe Menge von 40 erlaubten nur die Aufnahme eines ^{1}H-NMR-Spektrums ([D_6]Aceton) der verunreinigten Substanz.

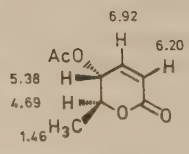
Bei 40 könnte es sich wie bei 38 und 39 um ein monoacyliertes Atromentinderivat handeln. Dafür sprechen 1) das beim Zerfall der Verbindung freiwerdende Atromentin, 2) "symmetrische Aromatensignale" im ^{1}H-NMR-Spektrum bei 6.92 und 7.36 (AA'BB'-System, J= 8.9 Hz) und 3) die im DC zu beobachtende violette Verfärbung von 40 mit NH_3-Dämpfen.

Das ^{1}H-NMR zeigt deutlich, daß 40 mit Atromentin (2) und einer weiteren Substanz verunreinigt ist.

Für die Verunreinigung kommen Signale bei δ~7.0 (verdeckt), 6.06 (dd, J= 9.9 und 1.4 Hz; 1H), ~4.8 (m; 2H) und 1.49 (d, J= 6.4 Hz; 3H) in Frage. Aufgrund dieser Signale sollte es sich um Osmundalacton (41) [74] handeln. In Abb.3 sind aus der Literatur [74] entnommene ^{1}H-NMR-Daten von 41 und O-Acetyl-osmundalacton (42) angegeben. Die geringen Unterschiede zwischen gemessenen und Literaturdaten könnten auf Lösungsmitteleffekte zurückgeführt werden.



41

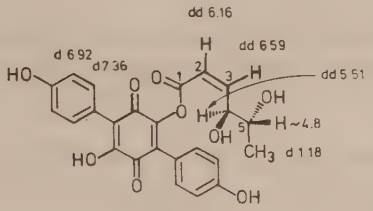


42

	J [Hz]	
	41	42
$J_{2,3}$	10	9.9
$J_{2,4}$	1.8	1.4
$J_{3,4}$	2.2	3.4
$J_{4,5}$	9.0	6.8
$J_{5,6}$	6.2	6.4

Abb.3. ^{1}H-NMR-Daten von Osmundalacton (41) und O-Acetyl-osmundalacton (42) nach HOLLENBEAK und KUEHNE [74] (gemessen in $CDCl_3$)

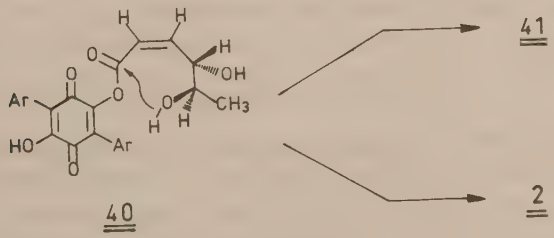
Nach Abzug der Verunreinigungen 2 und 41 verbleiben im ^{1}H-NMR-Spektrum für Orange-3 das bereits erwähnte "symmetrische" aromatische AA'BB'-System, die Doppeldubletts zweier vinylischer Protonen (6.59 und 6.16) eines cis-konfigurierten α,β-ungesättigten Carbonylsystems, die mit einem Proton bei 5.51 koppeln, ein von 41 verdecktes Signal bei ~4.8 und das Dublett einer Methylgruppe bei 1.18 ppm. Mit diesen Informationen kann für 40 folgende Konstitution vorgeschlagen werden:



40

	J [Hz]
$J_{2,3}$	11.5
$J_{2,4}$	0.5
$J_{3,4}$	10.3
$J_{4,5}$	4.1
$J_{5,6}$	6.4

Es muß allerdings darauf hingewiesen werden, daß es sich hierbei nur um einen ersten Vorschlag handelt, da weitere analytische Daten bisher nicht erhalten werden konnten. Die vorgeschlagene Konstitution würde aber zwanglos die Instabilität von 40 und das Auftreten von Atromentin und Osmundalacton als Verunreinigungen erklären, da 40 als aktiviertes Säurederivat leicht unter Bildung von 2 und 41 lactonisieren kann.

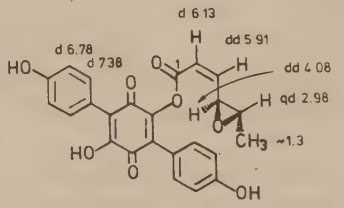


40

4.4. Orange-4 aus Fruchtkörpern von *Paxillus panuoides* var. *ionopus* Quel.

Orange-4 (43), das im DC einen orangefarbigen Fleck mit der für monoacylierte Atromentinderivate typischen violetten Verfärbung beim Behandeln mit NH_3-Dämpfen liefert, wurde von BESL und BRESINSKY [68] aus tiefgefrorenen Fruchtkörpern einer Varietät (var. *ionipus*) von *P.panuoides* mit olivbraunem Hut und violettfilziger Stielbasis isoliert.

Von ca. 2 mg stark verunreinigtem 43 konnte ein ^{1}H-NMR-Spektrum erhalten werden, das auf folgende Konstitution schließen läßt:



43

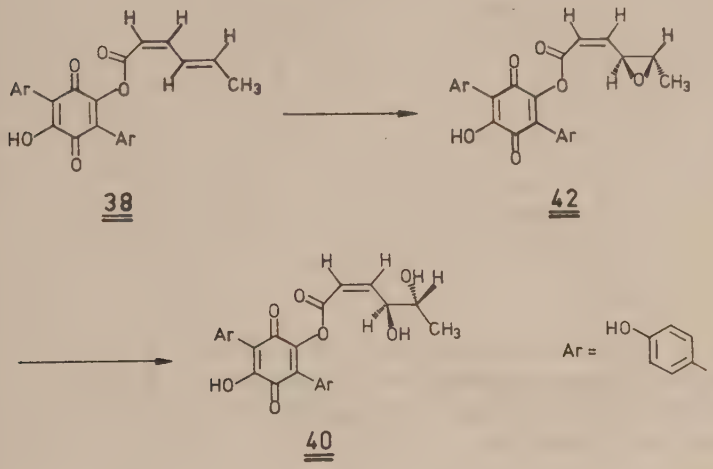
	J [Hz]
$J_{2,3}$	11.6
$J_{3,4}$	7.5
$J_{4,5}$	2
$J_{5,6}$	5

Allerdings ist im Spektrum das Signal der Methylgruppe durch fettähnliche Verunreinigungen und das des 5-H-Atoms durch den H_2O-Peak des Lösungsmittels teilweise verdeckt, so daß es sich auch hier, wie bei Orange-3 (40), um einen noch nicht gesicherten Vorschlag handelt, zumal keine weiteren analytischen Daten erhalten werden konnten. Die trans-Anordnung der Substituenten am Oxiran-Ring ergibt sich aus der beobachteten Kopplungskonstante von $J_{4,5}$ = 2 Hz [75].

Die vorgeschlagene Konstitution wird gestützt durch den Vergleich der ^{1}H-NMR-Spektren von natürlicher und synthetisierter Verbindung (siehe Kap.5.). Die geringen Unterschiede zwischen den beiden Spektren könnten auf die starken Verunreinigungen im Naturstoff zurückzuführen sein.

Es ist offensichtlich, daß Orange-4 (43) das biogenetische Bindeglied zwischen Orange-1 (38) und Orange-3 (40) ist, wobei nicht

ausgeschlossen werden kann, daß es sich bei 40 um ein bei der Aufarbeitung entstandenes Artefakt handelt. Epoxide mit benachbarter Doppelbindung werden leicht zu den entsprechenden Diolen hydrolysiert [76].



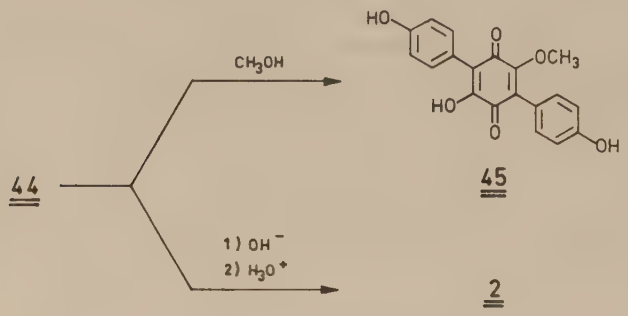
Die endgültige Bestätigung der für 43 und auch für 40 vorgeschlagenen Konstitution kann erst dann gegeben werden, wenn neues Pilzmaterial für weitere Untersuchungen zur Verfügung steht.

4.5. Violett-1 aus Kulturen von *Paxillus panuoides*

Violett-1 (44), ein von BESL und BRESINSKY [68] aus Mycelkulturen des Muschelkremplings (*P.panuoides*) isoliertes Pigment, liefert im DC (Laufmittel 1053) bei R_F = 0.39 einen violetten Fleck, dessen Farbe mit HCl-Dämpfen irreversibel nach grau-braun umschlägt.

44 löst sich in Aceton und Methanol und kann an Sephadex LH 20/ Aceton gereinigt werden.

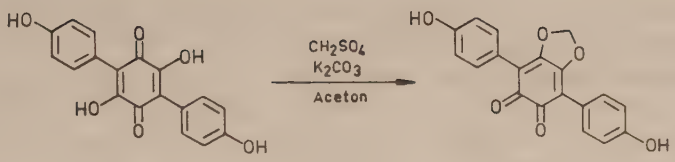
Bei Reinigungsversuchen an Sephadex LH 20/Methanol wurde die Bildung eines orange-braunen Farbstoffes beobachtet, der als Atromentin-3-methylether 45 [8c] identifiziert werden konnte.



Erwärmt man 44 mit 10%iger Natronlauge, so lassen sich nach dem Ansäuern dünnschichtchromatographisch Atromentin (2) und drei farblose Substanzen, von denen eine mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin anfärbbar ist, nachweisen.

Die Bildung von 2 und 45 läßt bei Violett-1 auf ein Atromentinderivat schließen, zumal im MS typische Atromentinpeaks bei m/e= 324 und 296 auftreten.

Mit verdünnter Säure verändert 44 die Farbe nicht, so daß ein Atromentinanion als Verursacher der violetten Verfärbung ausgeschlossen werden kann. Der Verdacht, daß die violette Farbe durch ein ortho-chinoides Atromentinderivat hervorgerufen wird, wurde durch den Vergleich des UV-Sepktrums - das die für ortho-Chinone typischen drei Absorptionsbanden zeigt [6] - von 44 mit dem des aus 2 und Methylensulfat synthetisierten 4',4"-Dihydroxyphlebiarubrons 46 bestätigt (Abb.4).



2 46

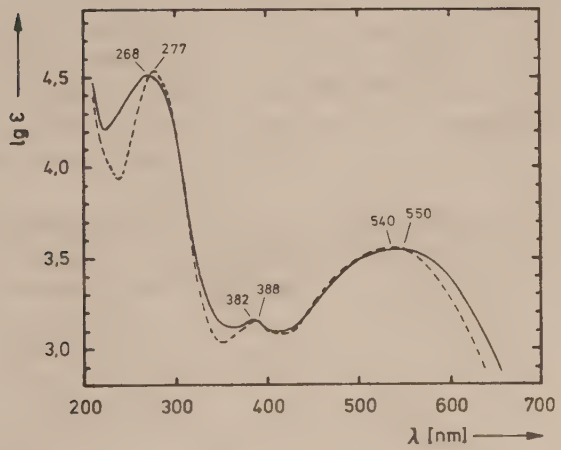


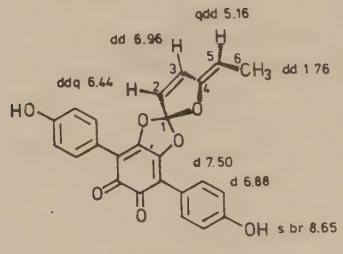
Abb.4. UV-Spektren (in EtOH) von Violett-1 (44) (——) und 4',4"-Dihydroxyphlebiarubron 46 (---)

Das im MS beobachtete Molekülion von 44 besitzt die Masse m/e= 416.0896 (ber. für $C_{24}H_{16}O_7$ 416.0896) und ist - typisch für chinoide Verbindungen - von einem (M^++2)-Peak begleitet. Die Elementarzusammensetzung von Violett-1 ist damit die gleiche wie die der vermuteten Konstitution von Orange-4 (43).

Wenn man davon ausgeht, daß 44 tatsächlich einen orthochinoiden Atromentinteil besitzt, so verbleibt ein bisher unbekannter C_6H_6O-Rest, der mit dem Atromentinteil verknüpft ist.

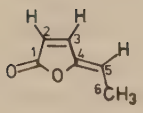
Aufschluß über die Art des Restes liefert das ^{1}H-NMR-Spektrum. Mit

Hilfe von Entkopplungsexperimenten und Vergleich der gefundenen Kopplungskonstanten mit Literaturdaten [77] der Verbindungen Methyl-protoanemonin A (47) und B (48) kann für Violett-1 auf folgende Konstitution geschlossen werden:



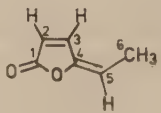
44

J [Hz]	
$J_{2,3}$	= 5.5
$J_{2,5}$	= 0.6
$J_{2,6}$	= 0.6
$J_{3,5}$	= 0.3
$J_{5,6}$	= 7.2



47

J [Hz]	
$J_{2,3}$	= 5.55
$J_{2,5}$	= 0.75
$J_{2,6}$	= 0.7
$J_{3,5}$	= 0.4



48

J [Hz]	
$J_{2,3}$	= 5.60
$J_{2,5}$	= 1.85
$J_{2,6}$	= 0.65
$J_{3,5}$	= 0.75

Die der exocyclischen Doppelbindung zugeordnete Z-Konfiguration stützt sich auf Beobachtungen von BOHLMANN et al. [78] an 4-Ylidenbutenoliden, bei denen die $J_{2,5}$-Kopplung bei Z-Konfiguration der exocyclischen Doppelbindung stets kleiner als bei E-Konfiguration ist (ca. 0.8 bzw. ca. 2 Hz).

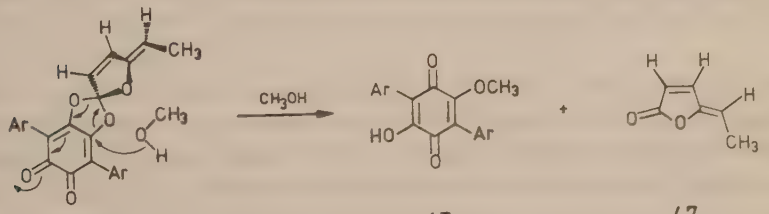
Einen zusätzlichen Beweis für die Z-Konfiguration der exo-DB und die richtige Zuordnung der Signale bei δ= 6.96 und 6.44 liefern Kern-Overhauser-Messungen. In Tabelle 7 ist der prozentuale Anstieg der Integrale des 5-H- und des Methylsignals beim Einstrahlen auf das 2-H (6.44 ppm) bzw. das 3-H-Signal (6.96 ppm) angegeben:

Tabelle 7. Kern-Overhauser-Messungen an Violett-1 (44)
(Lösungsmittel: [D_6]Aceton)

Einstrahlpunkt (ppm)	Intensitätssteigerung (%) 5-H-Atom	CH_3-Gruppe
6.44	21	-2
6.96	35	-3

Der starke Anstieg der Intensität des 5-H-Signals beim Einstrahlen auf die Resonanzfrequenz des 3-H-Atoms spricht für die räumliche Nähe der beiden H-Atome. Es muß allerdings darauf hingewiesen werden, daß Intensitätsänderungen aufgrund intermolekularer Dipol-Dipol-Wechselwirkungen [79] (Aceton als Lösungsmittel !) nicht ganz ausgeschlossen werden können.

Die eingangs erwähnte Bildung von Atromentin-3-methylether 45 beim Einwirken von Methanol (Sephadex-Säule) auf 44 ist evtl. nach folgendem Mechanismus möglich:



44 45 47

Das dabei ebenfalls freiwerdende Methyl-protoanemonin A (47) konnte nicht nachgewiesen werden; nicht zuletzt wegen der geringen Menge (ca. 10 mg) gereinigter Substanz, die für die gesamte Strukturaufklärung zur Verfügung stand.

Versuche, Violett-1 mit Dimethylsulfat/K_2CO_3/Aceton zu methylieren, schlugen fehl. Bei der Behandlung von 44 mit Diazomethan konnte nach drei Minuten Reaktionszeit das dimethylierte Produkt

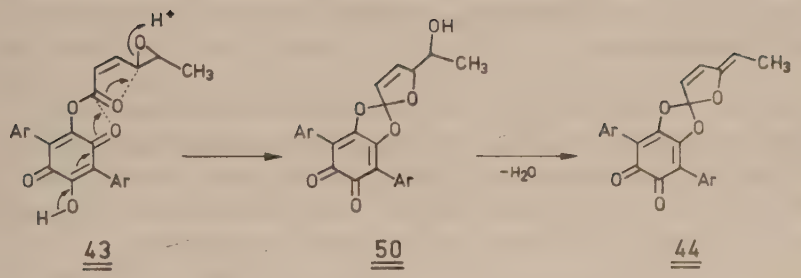
durch dünnschichtchromatographischen Vergleich mit synthetisiertem Material (siehe Kap.5.) nachgewiesen werden.

Für die Biogenese von 44 kommen prinzipiell 2 Möglichkeiten in Frage.
Bei der ersten ist der direkte Vorläufer von 44 ein Hexaeninsäurederivat 49, welches im Sinne der Pfeile zu 44 cyclisiert:

49 44

Die in höheren Pflanzen gebildeten 4-Ylidenbutenolide werden analog diesem Mechanismus aus den entsprechenden freien Säuren gebildet [24].

Im vorliegenden Fall ist allerdings die zweite Möglichkeit, nämlich Cyclisierung des Epoxids 43 mit anschließender H_2O-Eliminierung (Schema 12), durch das Auffinden der Vorläufer Orange-1 (38) und Orange-4 (43) bzw. dessen Hydrolyseprodukt Orange-3 (40) in Fruchtkörpern des Pilzes, wesentlich wahrscheinlicher. In diesem Zusammenhang ist interessant, daß im DC von Orange-4 stets 1-2 violette Begleitsubstanzen zu beobachten sind [80].



43 50 44

Ar = 4-HO-C_6H_4-

Schema 12. Wahrscheinliche Biogenese von Violett-1 in *P.panuoides*

Vielleicht gelingt auch noch die Isolierung oder der Nachweis des ebenfalls violett gefärbten Zwischenproduktes 50, wodurch der letztgenannte Biogeneseweg bestätigt würde.

In Kapitel 5. wird der Versuch beschrieben, Violett-1 (44) aus Orange-1 (38) durch eine biomimetische Synthese über das Epoxid 43 herzustellen.

Abschließend soll noch erwähnt werden, daß auch in Fruchtkörpern von *Paxillus atrotomentosus* schon öfter violette Pigmente beobachtet wurden [117]. Bisher konnte aber von keinem dieser Pigmente die Konstitution ermittelt werden.

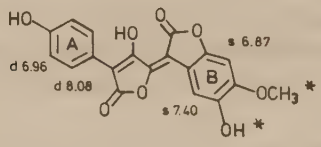
4.6. Rubin-1 aus Kulturen von *Serpula lacrymans*

Aus Mycelkulturen von *Serpula lacrymans* (Wulf.ex Fr.)Bond. [63] konnten kürzlich von BESL und BRESINSKY [68] mehrere "Rubine" isoliert werden, von denen die Rubin-1 (51) genannte Verbindung näher untersucht wurde.

Das Vorkommen von Hydroxypulvinsäuren - unter anderem auch Variegatorubin (20) - in *S.lacrymans* legt die Vermutung nahe, daß es sich bei 51 um ein Derivat von 20 oder eine ähnlich aufgebaute Verbindung handelt.

Aufgrund der im ^{1}H-NMR von 51 auftretenden Signale eines AA'BB'-Systems (δ= 6.96, 8.04, J= 9 Hz), zwei aromatischen Singuletts (6.87 und 7.40) und einer $-OCH_3$-Gruppe (3.96) kann mit Hilfe der ^{1}H-NMR-Daten ähnlicher Pulvinsäurederivate [81] auf das Vorliegen eines methylierten Isoxerocomorubins geschlossen werden.

Im MS wird dies durch den Molpeak bei 368.0529 (100%, ber. für $C_{17}H_{12}O_6$ 368.0532) bestätigt.
Aufschluß darüber, welcher aromatische Ring die $-OCH_3$-Gruppe trägt, geben die im MS beobachteten Sequenzen 161 → 133 → 105 → 77 und 207 → 179 → 151 [27,29,30]. Für Rubin-1 (51) ergibt sich damit folgende Konstitution:



51

* Stellung der Substituenten austauschbar.

Welche der beiden OH-Gruppen im Ring B die Methylgruppe trägt, ist dabei noch unsicher und kann erst nach vergleichenden Untersuchungen mit synthetisierten Substanzen geklärt werden. Die ersten methylierten Hydroxypulvinsäurederivate wurden kürzlich aus Kulturen von *Hygrophoropsis aurantiaca* isoliert [64]. Daß Verbindungen dieses Typs wie vermutet aus Ligninbruchstücken entstehen, ist,zumindest für die in *S.lacrymans* gefundenen Substanzen, nach den in Kap. 3.4.2. beschriebenen Biogeneseexperimenten nicht wahrscheinlich.

4.7. Pigmente aus Fruchtkörpern von *Boletus morissii*

Boletus morissii (Peck), ein in Nordamerika vorkommender Pilz, hat eine auffallend gelb gefärbte Stielbasis, die eine getrennte Untersuchung von Pilzhut und Pilzfuß sinnvoll erscheinen ließ.

Für die Untersuchungen standen uns einige getrocknete Herbarexemplare des Pilzes zur Verfügung, die uns freundlicherweise von B.S. LUTHER [+)] überlassen wurden.

- Pigmente aus dem Pilzhut

Das Dünnschichtchromatogramm (Laufmittel 1053) eines methanolischen Extraktes zeigt drei farbige Substanzen (R_F= 0.29, rot; R_F= 0.13, gelb und R_F= 0.01, gelb), von denen die beiden mit dem höheren R_F-Wert als Variegatsäure (18) und Variegatorubin (20) identifiziert werden konnten.

Bei der sehr polaren gelben Substanz (R_F= 0.01) handelt es sich um ein Substanzgemisch (erkennbar in einem DC mit sek-BuOH/HCOOH/H_2O = 75:15:10 als Laufmittel), das hauptsächlich in dem aus dem Pilzfuß gewonnenen Extrakt angereichert ist.

- Pigmente aus dem Pilzfuß

Durch Säulenchromatographie an Sephadex LH 20/Methanol konnte aus dem polaren gelben Gemisch eine Substanz (Substanz 52) einigermaßen sauber erhalten werden. 52 ist optisch aktiv und zeigt im UV-Spektrum Ähnlichkeit mit Variegatsäure (18).

Im ^{1}H-NMR-Spektrum sind Aromatensignale, die ebenfalls für ein Variegatsäuresystem sprechen, vorhanden. Interessant ist allerdings, daß im Ring B (Benzyliden-Ring) des vermuteten Variegatsäuresystems die beiden benachbarten aromatischen Protonen nur eine Kopplungskontante von 8.1 Hz (18: 8.5 Hz) zeigen. Multipletts im "Zukkerbereich" des Spektrums deuten darauf hin, daß es sich bei 52

[+)] B.S.LUTHER, Department of Botany, University of Tennessee, Knoxville, Tennessee, U.S.A.

evtl. um ein Glycosid von 18 handeln könnte. Aufgrund der Integrale müßten zwei Zuckerbausteine mit 18 verbunden sein.

Bei der Hydrolyse von 52 mit 10%iger Schwefelsäure wird 18 freigesetzt. Versuche, die vermuteten Zuckerreste dünnschichtchromatographisch nachzuweisen, schlugen fehl.

4.8. Pigment aus Fruchtkörpern von *Suillus americanus*

In einem methanolischen Extrakt von *S.americanus* [+)] konnte dünnschichtchromatographisch eine bisher unbekannte Substanz 53, welche einen etwas niedrigeren R_F-Wert als Grevillin D (13) besitzt, nachgewiesen werden. Bei 53 handelt es sich nicht um 13; dies zeigt deutlich die rote Verfärbung des DC-Fleckes von 53 beim Behandeln mit konz. Schwefelsäure. Grevillin D verfärbt sich mit konz. Schwefelsäure violett.

Bei einem Reinigungsversuch an Sephadex LH 20/Methanol trat Zersetzung der Substanz ein, so daß keine weiteren Untersuchungen mehr durchgeführt werden konnten.

Die Polarität von 53 und die rote Verfärbung mit H_2SO_4 lassen aber darauf schließen, daß es sich um ein bisher unbekanntes Grevillin handeln könnte. 53 sollte mindestens vier Hydroxygruppen besitzen und im Pyran- und Benzylidenring identisch mit Grevillin A (10) sein. Protoniertes 10 zeigt nämlich ebenfalls eine rote Verfärbung, während sich die im Benzylidenring 3,4-dihydroxylierten Grevilline violett verfärben. Evtl. handelt es sich bei 53 um das Grevillin mit dem gleichen aromatischen Substitutionsmuster wie Gomphidsäure (19).

[+)] Gesammelt 1977 von W.STEGLICH im Great Smoky Mountains National Park (U.S.A.).

In einem Extrakt von *S.americanus*, der uns 1978 freundlicherweise von Dr. U.WEISS [+)] überlassen wurde, konnte 53 nicht wiedergefunden werden. Die in dem Extrakt nachgewiesenen Pigmente, Grevillin B (11), C (12) und D (13) werden auch von BRESINSKY und BESL [5f)] als Inhaltsstoffe des Pilzes angegeben.

Es ist deshalb nicht auszuschließen, daß es sich bei der Aufsammlung 1977 nicht um *S.americanus*, sondern eine Varietät des Pilzes oder eine andere Art gehandelt hat.

4.9. Pigmente aus Fruchtkörpern von *Boletus retipes* und *Boletus ornatipes*

Die in Nordamerika vorkommenden Pilze *B.retipes* und *B.ornatipes* unterscheiden sich von den meisten anderen Arten der Gattung *Boletus* durch das Fehlen der typischen Hydroxypulvinsäuren. Das Fleisch der Pilze ist tief chromgelb gefärbt, wodurch die Finger beim Berühren ebenfalls tiefgelb gefärbt werden, und beim Trocknen werden schwarze Zersetzungsprodukte gebildet [5f)].

Wie DC-Untersuchungen zeigten, enthalten die Pilze gleiche bzw. ähnliche Pigmente, von denen zwei einigermaßen rein erhalten werden konnten. Es gelang bisher aber nicht, die Konstitution der Verbindungen zu klären. Da es sich wahrscheinlich um einen interessanten Verbindungstyp handelt, sollen im folgenden die bisher gewonnenen Ergebnisse aufgeführt werden.

- *Boletus retipes*

Aus einigen getrockneten Exemplaren von *B.retipes* [++)] konnte aus der Vielzahl der vorkommenden Pigmente eine schwach gelb gefärbte Substanz 54 abgetrennt werden, die im DC (Laufmittel 1053) bei R_F = 0.36 einen fast farblosen Fleck zeigt und sich beim Behandeln

---

[+)] Dr.U.WEISS, National Institute of Health, Bethesda, Maryland (U.S.A.).

[++)] Gesammelt 1977 von W.STEGLICH im Great Smoky Mountains National Park (U.S.A.).

mit NH_3-Dämpfen intensiv gelb verfärbt.

Der massenhöchste Peak (m/e= 476) im MS von 54 hat eine Elementarzusammensetzung von $C_{26}H_{20}O_9$ und ist wahrscheinlich der $(M^+ +2)$-Peak eines chinoiden Systems. Aus dem vermuteten Molekülion bei m/e= 474 werden konsekutiv CO_2, H_2O und CO abgespalten; der basepeak bei m/e= 225 hat die Elementarzusammensetzung von $C_{15}H_{13}O_2$.

Das UV-Spektrum (Abb.5) zeigt Maxima bei 223, 319 und 434 nm (lg ε = 4.14, 3.71 und 3.59), bei Zugabe von NaOH entstehen Banden bei 242 und 383 nm (lg ε = 3.99 und 3.87). Nach Zusatz von HCl bleiben die ursprünglichen Maxima erhalten, aber die Extinktion der Bande bei ~435 nm (lg ε = 3.28) wird kleiner.

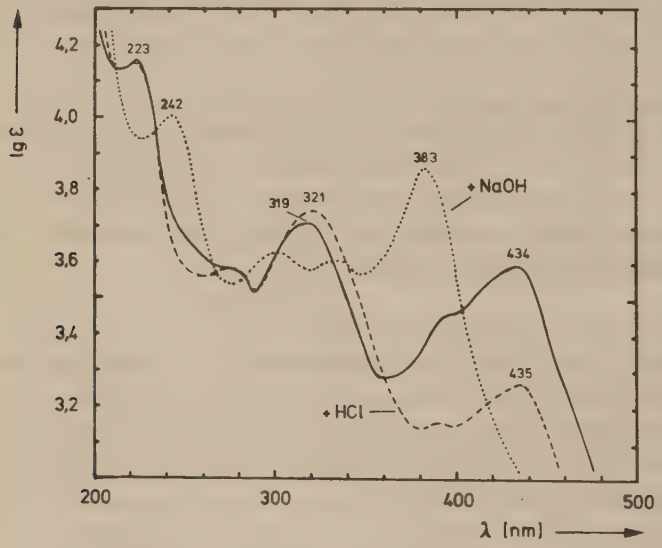


Abb.5. UV-Spektrum (in Acetonitril) von 54 aus *B.retipes*
——— neutral; ····· + NaOH; ----- + HCl.

Im IR-Spektrum sind neben Hinweisen für OH- und CH-Gruppen Banden für ein ungesättigtes γ-Lacton, ein aromatisches Keton, ein chinoides und ein aromatisches System vorhanden.

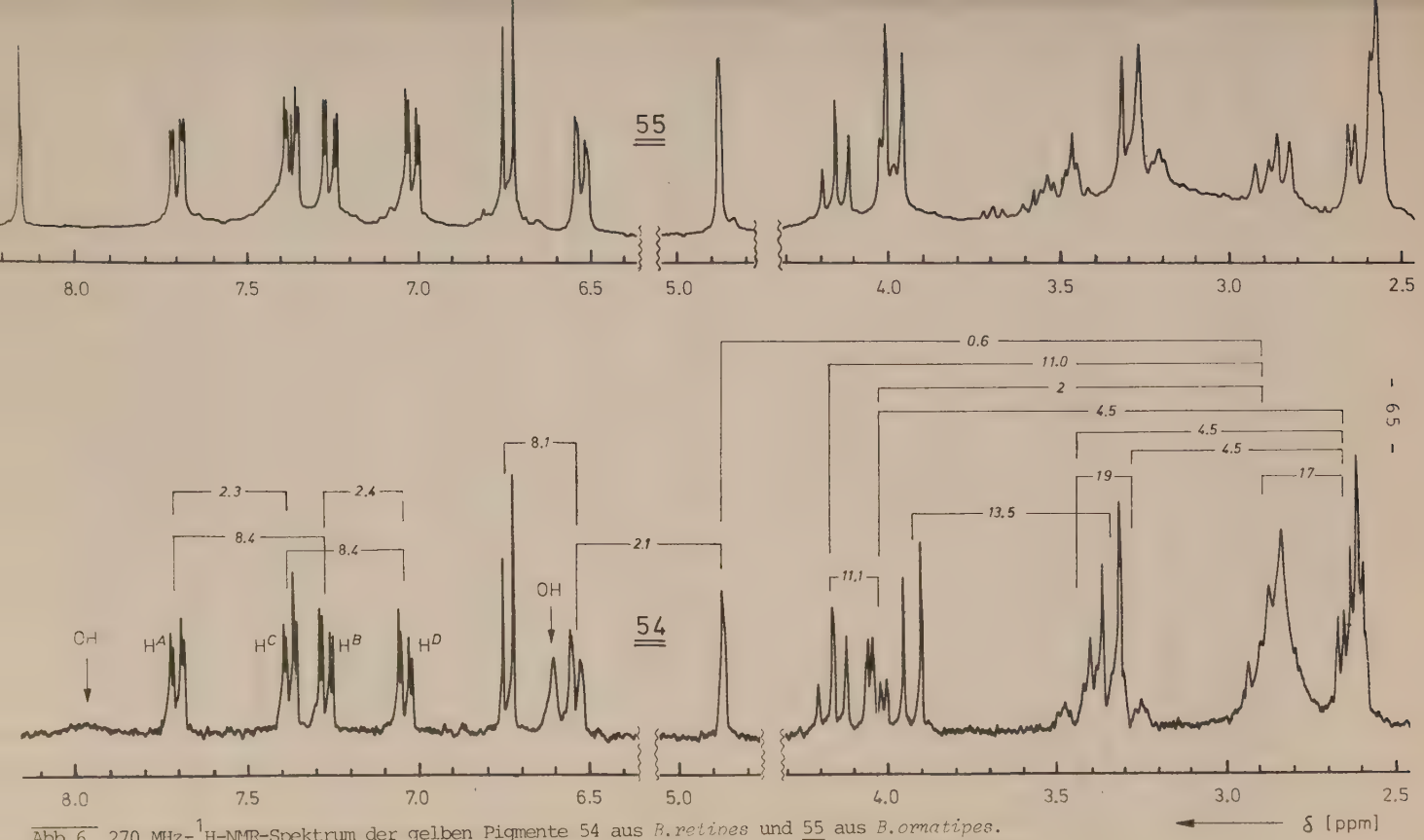
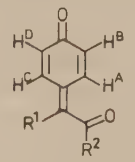


Abb.6. 270 MHz-^{1}H-NMR-Spektrum der gelben Pigmente 54 aus *B.retipes* und 55 aus *B.ornatipes*. Die durch Einstrahlexperimente festgestellten Kopplungen zwischen den einzelnen Signalgruppen sind gekennzeichnet.

Das ^{1}H-NMR-Spektrum (270 MHz [+], Abb.6) zeigt im aromatischen Bereich die Signale zweier AB-Systeme ($J_{A'B'} = J_{A''B''} = 8.4$ Hz), bei denen die A-Teile ($J_{A'A''} = 2.3$ Hz) und auch die B-Teile ($J_{B'B''} = 2.4$ Hz) miteinander koppeln.

Ein "para-substituiertes" 6-Ring-System, wie z.B. ein Chinonmethid der Art XI, bei dem die vier Ringprotonen chemisch nicht äquivalent sind, würde eine solche Kopplung erklären.



XI

Obwohl am Ring unsubstituierte Chinonmethide normalerweise nicht stabil sind [82], wäre bei dem System XI durch die in Konjugation stehende Carbonylgruppe (vinyloges Chinon !) eine gewisse Stabilität zu erwarten.

Tatsächlich wird von WANZLICK et al. [83] ein Chinomethidsystem der Art XI, das als Zwischenprodukt bei einer Xylerythrin-Synthese auftritt und bei dem auch die Nichtäquivalenz der Ringprotonen beobachtet wurde, beschrieben. Allerdings stimmen einige NMR-Daten, wie z.B. die Kopplungskonstante von 10 Hz nicht gut mit denen, der aus *B.retipes* isolierten Verbindung überein.

Zu erwähnen ist, daß das Spektrum noch mehrere AB- bzw. ABX-Systeme erkennen läßt, wobei bei einigen durch die chemische Verschiebung und die Kopplungskonstante auf das Vorliegen von geminalen 5-Ring-Protonen geschlossen werden kann.

Versuche, aus der nur in geringer Menge erhaltenen Verbindung 54 durch Acetylierung, reduktive Acetylierung, Methylierung und Hy-

---

[+] Herrn Priv.Doz.Dr.G.HÖFLE, TU Berlin, danke ich für die Aufnahme der 270 MHz-Spektren.

drierung Derivate zu erhalten, schlugen fehl.

Ebenso konnte aus einer größeren Menge von *B.retipes*, die in Methanol eingelegt waren, das mit NH_3 gelb färbende Pigment 54 nicht mehr erhalten werden.

- *Boletus ornatipes*

Aus einigen getrockneten Herbarexemplaren von *B.ornatipes* [+], die schon ziemlich schwarz verfärbt waren, konnten zwei Pigmentfraktionen isoliert werden, die in Lauf- und Anfärbeverhalten dem aus *B.retipes* isolierten Pigment 54 ähnlich sind. Das 270 MHz-Spektrum zeigt, daß Fraktion 2 ein Gemisch zweier Substanzen ist, von denen eine mit 54 aus *B.retipes* identisch ist.

Fraktion 1 enthält eine Substanz 55, die im ^{1}H-NMR (Abb.6) nur geringe Unterschiede zu 54 aus *B.retipes* zeigt. Weitere analytische Daten konnten wegen der Zersetzung von 55 nicht mehr erhalten werden.

Die endgültige Aufklärung der sicherlich interessanten Konstitution der Pigmente aus *B.retipes* und *B.ornatipes* dürfte wahrscheinlich erst dann gelingen, wenn neues Material aus getrockneten Exemplaren der Pilze zur Verfügung steht.

4.10. Diarylcyclopentandione aus Fruchtkörpern von *Gyrodon lividus*

Das Fruchtfleisch des zur Familie der Boletaceae gehörenden Erlengrüblings, *Gyrodon lividus* (Bull.ex Fr.)Sacc.,verfärbt sich bei Verletzung des Pilzes blau. Als mögliche Ursache dieser Blauverfärbung wurde in einer früheren Untersuchung [5a] bereits Variegatsäure (18) nachgewiesen.

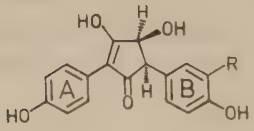
[+] Gesammelt 1977 im Great Smoky Mountains National Park (U.S.A.) von B.S.LUTHER, der die Exemplare freundlicherweise für die Untersuchungen zur Verfügung stellte.

Eine ebenfalls auftretende Bräunung, die insbesondere an Druckstellen beobachtet wird, war der Grund für eine erneute Untersuchung des Pilzes [84].

Dabei konnten neben Variegatsäure und Variegatorubin (20) noch zwei weitere, fast farblose kristalline Substanzen isoliert werden.

Besprüht man ein Dünnschichtchromatogramm der Substanzen mit wäßriger $K_3[Fe(CN)_6]/NaHCO_3$-Lösung, so wird bei R_F= 0.25 ein blauschwarzer bzw. bei R_F= 0.17 ein rotbrauner Fleck sichtbar.

Bei beiden Verbindungen treten im ^{1}H-NMR-Spektrum außer aromatischen Signalen die Dubletts von zwei Protonen auf, die in Kopplungskonstante (J= 7 Hz) und chemischer Verschiebung ($\delta \sim 4.0$ und 4.8) mit denen der cis-ständigen Protonen des Cyclopentandionringes von Chamonixin (29) [39] und Involutin (30) [40] übereinstimmen.



29 Chamonixin: R = H

30 Involutin: R = OH

Durch die weiteren spektroskopischen Untersuchungen und den Vergleich mit Literaturdaten wurde der Verdacht, daß es sich bei der mit $K_3[Fe(CN)_6]/NaHCO_3$ blauschwärzenden Substanz um Chamonixin und bei der rotbräunenden um Involutin handelt, bestätigt.

Während das isolierte Involutin in allen spektroskopischen Daten und in der absoluten Konfiguration mit linksdrehendem Involutin aus *Paxillus involutus* [40a] übereinstimmt, ist das erhaltene Chamonixin das Enantiomere der aus *Chamonixia caespitosa* [39] bekannten Verbindung, also (-)-Chamonixin. Dies geht deutlich aus dem CD-Spektrum (Abb.7) und dem optischen Drehwert hervor.

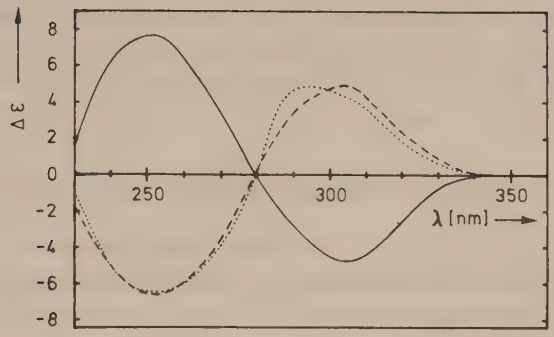


Abb.7. CD-Spektren von (+)-Chamonixin (———) aus *Chamonixia caespitosa* und (-)-Chamonixin (-----) und Involutin (·····) aus *Gyrodon lividus*

(-)-Chamonixin war vorher schon als Begleiter des Involutins aus *P.involutus* vermutet worden, konnte aber nicht von diesem abgetrennt werden [39].

Für die erwähnte Blauverfärbung von *G.lividus* kann also zusätzlich zur Variegatsäure auch Chamonixin verantwortlich sein, denn beide liefern (siehe Allgemeiner Teil) bei der Oxidation blau gefärbte Verbindungen [27,28,39].

Die beobachtete Bräunung ist wahrscheinlich auf die Anwesenheit des Involutins zurückzuführen. Eine bräunliche Verfärbung von Druckstellen wird auch in *Paxillus involutus* beobachtet [40a], und bei der Oxidation mit $K_3[Fe(CN)_6]/NaHCO_3$-Lösung entsteht, wie schon erwähnt, eine braunrote Substanz.

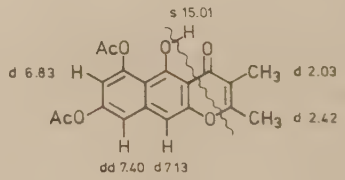
Die in *Gyrodon lividus* gefundenen Cyclopentandione 29 und 30 sind für die chemosystematische Einordnung des Pilzes interessant. Einerseits sind sie ein Argument für die Beziehungen zur Familie der Paxillaceae,und andererseits ist die Verwandtschaft zur Gattung *Gyroporus* offensichtlich. Aus *Gyroporus cyanescens* wurden die Oxidationsprodukte des Chamonixins, Gyrocyanin (26) und Gyro-

porin (27) isoliert [38]. Die von SINGER [85] vorgenommene Einordnung, bei der die Gattungen *Gyrodon* und *Gyroporus* in einer eigenen, noch relativ enge Beziehungen zu den Paxillaceen besitzenden Unterfamilie Gyrodontideae geführt werden, wird durch die gefundenen Inhaltsstoffe bestätigt.

4.11. Acetat eines gelben Pigmentes aus Kulturen von *Cordyceps ophioglossoides*

C.ophioglossoides (Ehrenbg. ex Fr.)Link, die Zungen-Kernkeule, wächst als Parasit auf lebenden unterirdischen Hirschtrüffeln, die vom Pilzmycel durchwuchert werden. Die Fruchtkörper sind zuerst fuchsiggelb und laufen bei der Reife schwärzlich an [86]. In Mycelkultur produziert *C.ophioglossoides* große Mengen an gelb gefärbten Pigmenten, die leicht zu schwarzen Produkten oxidiert werden und die wahrscheinlich auch für die schwarze Pilzverfärbung verantwortlich sind.

Von einem der gelben Pigmente konnte von BESL und BRESINSKY [68] ein Acetat 56 erhalten werden, das spektroskopisch untersucht wurde und für das folgende Konstitution vorgeschlagen wird:



56

Die aus den ^{1}H-NMR-Daten abgeleitete Konstitution wird gestützt durch das Massenspektrum, das den erwarteten Molpeak sowie zwei konsekutive Ketenabspaltungen und eine aus dem Molekülion erfolgende Abspaltung einer C_4H_7CO-Einheit zeigt.

Nicht erklärbar mit der vorgeschlagenen Konstitution ist aller-

dings die beobachtete schwarze Verfärbung des nichtacetylierten Pigmentes.

4.12. Pigmente aus Kulturen von *Oudemansiella badia*

Aus dem Rohextrakt einer Mycelkultur des Blätterpilzes *Oudemansiella badia* (Quel.)Mos. konnte durch Säulenchromatographie eine orangegelbe Farbstoff-Fraktion erhalten werden, die im DC (Laufmittel CH_2Cl_2) einen einheitlichen gelben Fleck bei R_F= 0.82 liefert. Besprüht man das DC mit konz. Schwefelsäure, so tritt eine dunkelblaue bis schwarze Verfärbung des Substanzfleckes ein.

Im UV beobachtet man bei 400 und 412 nm eine starke Extinktion, was auf ein ausgedehntes konjugiertes System schließen läßt, und im IR treten intensive Banden bei 1772 und 1748 auf, die auf ein α,β-ungesättigtes γ-Lacton hinweisen [87].

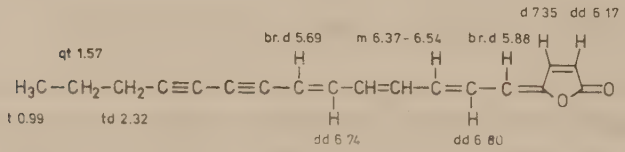
Im 90 MHz-^{1}H-NMR-Spektrum erscheinende Dubletts (J= 5.5 Hz) bei δ= 6.17 und 7.35 (das Signal bei 6.17 zeigt noch eine Fernkopplung) sprechen für das Vorliegen eines 4-Ylidenbutenolid-Systems. Weiterhin sieht man ein starkes Multiplett im vinylischen Bereich, sowie Signale einer Methyl- und einer Propylgruppe, die beide an ein ungesättigtes System gebunden sein könnten.

Zusätzliche Informationen wurden aus einem 500 MHz-^{1}H-NMR-Spektrum [+)] erhalten. Hier zeigte sich zunächst, daß die als einheitlich angesehene Farbstoff-Fraktion aus zwei Substanzen 57 und 58, die im Verhältnis 2:1 vorliegen, besteht.

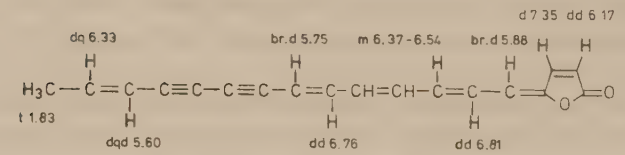
Dies wurde auch durch das MS bestätigt, das bei m/e= 264 ($C_{18}H_{16}O_2$) und 262 ($C_{18}H_{14}O_2$) zwei Molpeaks erkennen läßt.

+) Der Fa. Bruker, Karlsruhe, danke ich für die Aufnahme des Spektrums.

Der vinylische Bereich im 500 MHz-^{1}H-NMR ist teilweise aufgelöst, und mit Hilfe der beobachteten Kopplungen können für 57 und 58 die vorgeschlagenen Konstitutionen abgeleitet werden.



57



58

Bei beiden Verbindungen ergibt sich die Z-Konfiguration der exocyclischen Doppelbindung aufgrund der Kopplungskonstante - die kleiner als 1 Hz ist - zwischen den H-Atomen an C-2 und C-5 [78]. Über die Konfiguration der Doppelbindung an C-8 kann keine Aussage gemacht werden.

Daß statt der vorgeschlagenen zwei in Konjugation stehenden Acetylenbindungen nur eine Acetylen- und an anderer Stelle des Moleküls (z.B. direkt am Butenolid-Ring) eine Kumulenbindung vorhanden ist, scheint nicht wahrscheinlich zu sein. "Longe-range"-Kopplungen über eine Acetylenbindung liegen in der Größenordnung von 2.5 Hz [78,88]; die beobachteten Kopplungskonstanten von 1.2 Hz bei 57 und 1 Hz bei 58 stimmen eher mit der für Hexa-2,4-diin angegebenen von 1.3 Hz überein [88].

Anzumerken ist noch, daß im IR die typische Acetylenbande bei 2200 cm^{-1} [89] nur sehr schwach zu sehen ist. Es ergeben sich aber

auch keine Hinweise aus dem IR für das Vorliegen eines Kumulensystems.

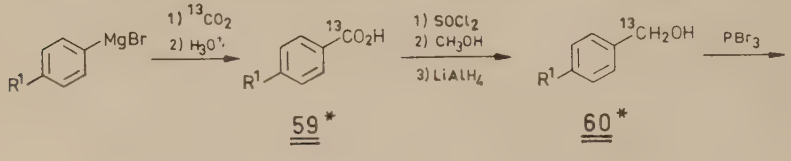
Die beiden in *O.badia* gefundenen Ylidenbutenolide sind biogenetisch offensichtlich aus C_{18}-Polyinen entstanden. Obwohl schon zahlreiche Polyine, besonders aus Höheren Pflanzen (Compositae) [90], aber auch aus Pilzen [1] isoliert worden sind, sind Verbindungen mit 18 C-Atomen seltener [90]. Meines Erachtens handelt es sich bei 57 und 58 um die ersten bekanntgewordenen, wahrscheinlich über den Fettsäureweg gebildeten C_{18}-Ylidenbutenolide [24].

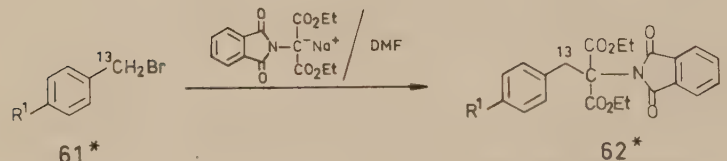
5. Synthesen

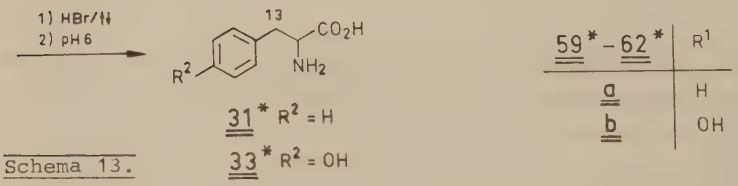
5.1. Synthese der ^{13}C-markierten Verbindungen

5.1.1. ^{13}C-Phenylalanin und ^{13}C-Tyrosin

Für die Synthese der wertvollen ^{13}C-markierten Aminosäuren [+)] mußte ein Weg gefunden werden, der im Halbmikromaßstab durchzuführen war und der die Verbindungen rein und in möglichst hoher Ausbeute lieferte. Auf eine der beschriebenen enantioselektiven Synthesen (vgl. z.B. [91a)]) wurde verzichtet, weil bei Bedarf leicht eine Enantiomerentrennung durchgeführt werden kann [++)].







Schema 13.

Nach einem Vergleich der in der Literatur beschriebenen allgemeinen Synthesemethoden [91)] und einigen Vorversuchen wurden DL-[3'-^{13}C]Phenylalanin (31*) und DL-[3'-^{13}C]Tyrosin (33*) auf dem in Schema 13 gezeigten Weg hergestellt.

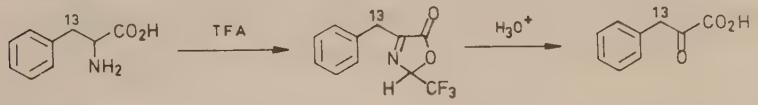
+) 0.25 g DL-[3'-^{13}C]Phenylalanin kosten im Handel (Amersham-Buchler 1980) 830,-- DM.

++) Nach CLEMENT und POTTER [92)] wurde z.B. nichtmarkiertes DL-Phenylalanin über den N-Acetyl-methylester enzymatisch mit Chymotrypsin [93)] in die Enantiomeren getrennt.

Es handelt sich dabei um die von SÖRENSEN [94] entwickelte "Aminomalonestersynthese" mit der - nach einigen Verbesserungen in der Verfahrensdurchführung - die beiden Aminosäuren mit jeweils ca. 50% Gesamtausbeute (bez. auf $Ba^{13}CO_3$) erhalten werden konnten.

5.1.2. ^{13}C-Phenylbrenztraubensäure

Ein Teil des ^{13}C-Phenylalanins 31* wurde nach der von WEYGAND, STEGLICH et al. [95] beschriebenen Methode über das 2-Trifluormethyl-3-oxazolin-5-on 63* in Phenyl-[3-^{13}C]brenztraubensäure 64* überführt.



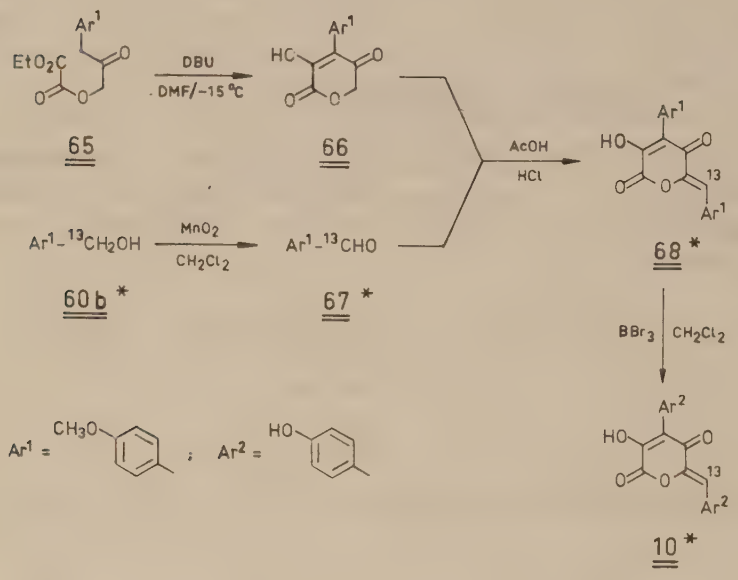
31* 63* 64*

Bei Verfütterungsexperimenten kam 64* noch nicht zum Einsatz.

5.1.3. ^{13}C-Grevillin A

^{13}C-Grevillin A 10* wurde in Anlehnung an bereits beschriebene Grevillinsynthesen [42,69,96] hergestellt (Schema 14).
Für die Synthese war zunächst die Herstellung des ^{13}C-Anisaldehyds 67* [97] und des Pyrons 66 [69] notwendig.
Den Aldehyd 67* erhält man in guter Ausbeute (94%) aus dem bei der ^{13}C-Tyrosinsynthese als Zwischenprodukt auftretenden Alkohol 60b* durch Oxidation mit Mangandioxid.
Das Pyron 66 entsteht durch intramolekulare Claisen-Kondensation aus dem Oxalester 65. Bei der bekannten Grevillinsynthese bildet dieser Schritt eine "Schwachstelle", da hierbei nur Ausbeuten bis maximal 42% erhalten werden [69].
Ersetzt man das bisher zur Cyclisierung verwendete Kalium-tert-butylat durch DBU [98] und arbeitet bei niedrigerer Temperatur

(-15°C), so entsteht das Pyron 66 in 70%iger Ausbeute [+]; außerdem kann man auf HMPT als Lösungsmittel verzichten und stattdessen in DMF arbeiten.



Schema 14.

Ein Versuch, den als Ausgangsprodukt leichter zugänglichen Phenylbrenztraubensäure-carbethoxy-methlyester 69 [42] zum entsprechenden Pyron 70 zu cyclisieren, lieferte unter den "neuen" Cyclisierungsbedingungen unumgesetztes Ausgangsmaterial:

69 70

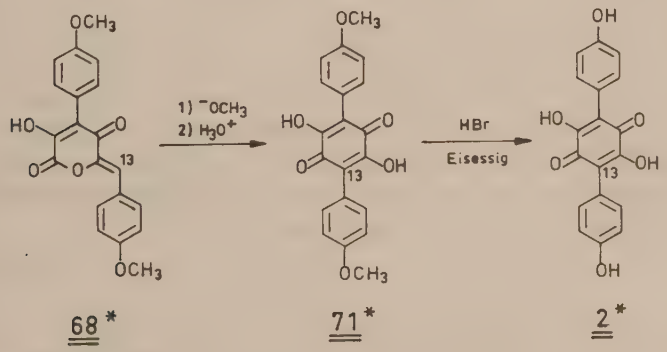
[+] Als Nebenprodukte bei der Cyclisierung entstehen Oxalsäurediethylester und 3-(4-Methoxyphenyl)-2-oxopropanol. Deren Bildung ist verständlich, wenn man annimmt, daß bei dem Cyclisierungsschritt freigesetztes Ethylat nucleophil mit noch nicht cyclisiertem Ausgangsprodukt reagiert.

Der bei der Kondensation von ^{13}C-Anisaldehyd 67* mit 66 erhaltene ^{13}C-Grevillin-A-dimethylether 68* wurde wie üblich [42] mit BBr_3 in ^{13}C-Grevillin A 10* überführt. Die Ausbeute an 10* (bez. auf 67*) betrug 61%.

5.1.4. ^{13}C-Atromentin

Die meisten der in der Literatur beschriebenen Terphenylchinonsynthesen [6,99] sind verlustreich und zur Darstellung von z.B. unsymmetrischen und im Chinonring spezifisch markierten Verbindungen nicht geeignet. Elegant lassen sich solche Terphenylchinone auf dem von LOHRISCH [42] gefundenen Weg der basenkatalysierten Umlagerung von Grevillinderivaten herstellen. Durch die in 5.1.3. beschriebene Verbesserung der Grevillinsynthese ist dieser Weg auch für einfache (symmetrische) Terphenylchinone die "Methode der Wahl".

Durch Umlagerung von ^{13}C-Grevillin-A-dimethylether 68* wurde so der ^{13}C-Atromentin-dimethylether 71* erhalten, welcher durch Spaltung mit HBr/Eisessig in [3-^{13}C]Atromentin 2* überführt werden konnte (Schema 15).

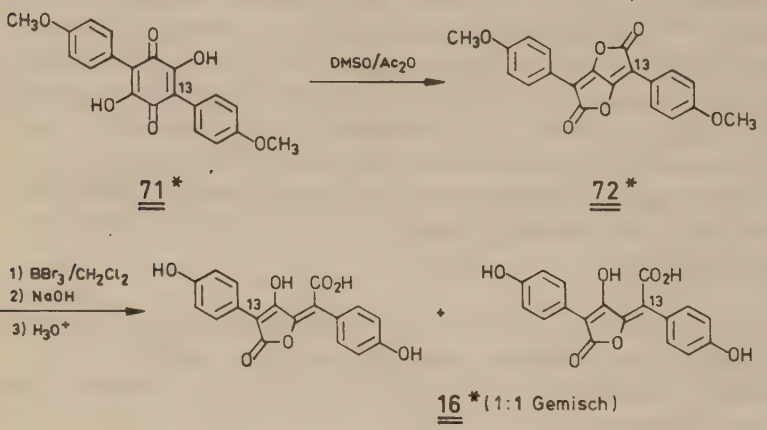


68* 71* 2*

Schema 15.

5.1.5. ^{13}C-Atromentinsäure

Nach WIKHOLM und MOORE [45] wurde mit DMSO/Ac_2O durch oxidative Ringöffnung des ^{13}C-Atromentin-dimethylethers 71* der ^{13}C-Atromentinsäurelacton-dimethylether 72* hergestellt. Die Etherspaltung mit BBr_3 und Lactonringöffnung lieferte ^{13}C-Atromentinsäure 16* in 28%iger Ausbeute (Schema 16).



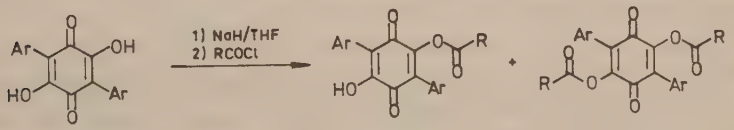
Schema 16.

Bei einem Versuch, nichtmarkiertes Dilacton 72 mit HBr 48%ig/Eisessig = 1:4 zu spalten, wurde nach 15stündigem Kochen neben einer Reihe von Produkten auch Gyrocyanin (26) erhalten. Versuche, die Ausbeute von Gyrocyanin durch Veränderung der Reaktionsbedingungen zu erhöhen, blieben erfolglos.

5.2. Synthese von mono- und diacylierten Terphenylchinonen über die Natrium- und Thalliumsalze

Behandelt man Polyporsäure (1) oder Atromentin (2) unter Säure- (H_2SO_4) oder Pyridin-Katalyse mit Acylierungsmitteln, so erhält man glatt die peracylierten Derivate [100]. Um bei 2 selektiv die beiden Chinonring-Hydroxygruppen zu acylieren, verwenden EDWARDS und KALE [101] den über einen langwierigen Weg synthetisierten Atromentin-4',4"-di-methoxymethylether, bei dem nach der Acylierung die Schutzgruppen leicht wieder abgespalten werden können. In der Literatur ist aber keine Methode beschrieben, um am Chinonring monoacylierte Polyporsäure- oder Atromentin-Derivate herzustellen.

Dies gelingt - allerdings nur in mäßiger Ausbeute - wenn man aus dem entsprechenden Terphenylchinon in THF mit der äquimolaren Menge Natriumhydrid das Natriumsalz herstellt und dieses mit einem Säurehalogenid umsetzt. Dabei entsteht neben dem gewünschten monoacylierten 73 auch immer das diacylierte Produkt 74 (Schema 17). Durch Säulenchromatographie können beide voneinander getrennt werden.



1 Ar = C_6H_5-

2 Ar = 4-HO-C_6H_4-

71 Ar = 4-CH_3O-C_6H_4-

73 a-j

74 a-i

Schema 17.

Geht man bei dieser Methode von Atromentin aus, das vier acylierbare Hydroxy-Gruppen besitzt, so beobachtet man keine Produkte, bei denen die phenolischen (weniger aciden) Hydroxy-Gruppen acyliert sind.

Die mit dem NaH/THF-Verfahren (Methode A) hergestellten Verbin-

dungen, unter anderem Orange-1 (38), Orange-2 (39) und als "Nebenprodukt" Aurantiacin (5) sind in Tabelle 8 zusammengefaßt.

Tabelle 8. Acylierte Terphenylchinone (73 = monoacyliert, 74 = diacyliert)

R	Ar	Methode [a]	73	Ausb. [%]	74	Ausb. [%]
H_3C-(CH=CH)$_2$-	C_6H_5-	A	a	17	a	37
"	4-OH-C_6H_4-	A	b [b]	33	b	21
"	4-CH_3O-C_6H_4-	B	c	27	c	32
		C		62		-
H_3C-(CH=CH)$_2$-	C_6H_5-	B	d	40	d	7
"	4-OH-C_6H_4-	A	e	31	e	24
"	4-CH_3O-C_6H_4-	A	f	30	f	17
		C		69		-
CH_3-	4-OH-C_6H_4-	A	g [c]	38	g [d]	16
C_6H_5-	4-OH-C_6H_4-	A	h	13	h	11
C_6H_5-CH_2-	C_6H_5-	A	i	26	i	22
4-CH_3O-C_6H_4-CH_2-	C_6H_5-	C	j	71		-

a) A= NaH/THF; B= Tl(OEt)/THF; C= cyclisches Carbonat
b) = 38; c) = 39; d) = 5

Das für die Synthese der cis,trans-Sorbinoyl-Derivate benötigte cis,trans-Sorbinsäurechlorid erhält man mit Oxalylchlorid aus cis,trans-Sorbinsäure [102], die aus δ-$\Delta^{\alpha,\beta}$-Hexenolacton (Parasorbinsäure) [103] hergestellt wird [104].

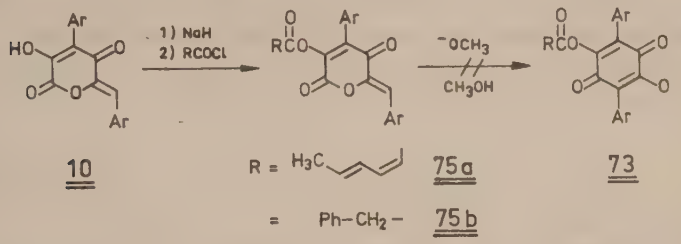
Statt dem Natriumsalz kann man für die Acylierungen auch das aus Terphenylchinon und Thallium-ethylat hergestellte Thallium-(I)-Salz einsetzen [105] (Methode B, Tabelle 8). Bei der Umsetzung von Polyporsäure mit Sorbinsäurechlorid wird dabei ein günstiges Verhältnis von monoacyliertem zu diacyliertem Produkt erzielt.

Die beiden bisher beschriebenen Methoden sind aber dennoch unbefriedigend, da mit ihnen die gewünschten monoacylierten Produkte nicht selektiv und nicht in höherer Ausbeute zugänglich sind. Es wurde deshalb nach anderen Wegen gesucht, die dies ermöglichen sollten.

5.3. Versuche zur selektiven Darstellung von monoacylierten Terphenylchinonen

5.3.1. Durch Umlagerung von Grevillinen

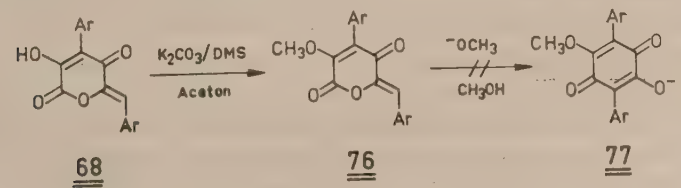
Erfolgversprechend, zumindest auf dem Papier, schien der in Schema 18 gezeigte Weg zur Darstellung der monoacylierten Terphenylchinone zu sein. Die monoacylierten Grevillin-Derivate 75 sollten sich nach LOHRISCH [42] gezielt in die entsprechenden Terphenylchinone 73 umlagern lassen.



Schema 18.

Während der erste Schritt, die Acylierung des Grevillin-A-dimethylethers 68 glatt verlief, wurde bei der Behandlung von 75 mit Natriummethylat in Methanol keine Umlagerung in die gewünschten Terphenylchinone 73 beobachtet. Bei Raumtemperatur erfolgt keine Reaktion, bei höherer Temperatur entsteht eine Reihe von Zersetzungsprodukten, die nicht weiter untersucht wurden.

Ebenfalls gelang es nicht, den mit K_2CO_3/Dimethylsulfat/Aceton hergestellten Grevillin-A-trimethylether 76 in Atromentin-trimethylether 77 umzulagern (Schema 19).

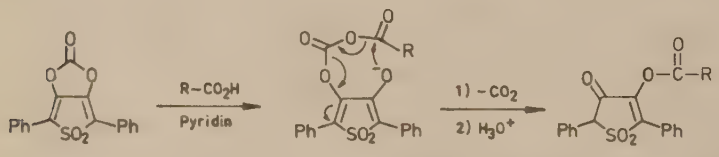


Schema 19.

Der negative Verlauf der Umlagerungsversuche war überraschend, und es kann keine plausible Erklärung für das im Gegensatz zum "freien" Grevillin-A-dimethylether 68 inerte Verhalten der acylierten und methylierten Derivate bei der Behandlung mit $^{-}OCH_3$/CH_3OH gegeben werden.

5.3.2. Über cyclische Carbonate von Terphenylchinonen

Eine weitere Möglichkeit zur Herstellung monoacylierter Derivate beruht auf der von STEGLICH et al. [106] gefundenen Methode, cyclische Carbonate der Art 78 zur Aktivierung von Carbonsäuren zu verwenden (Schema 20).

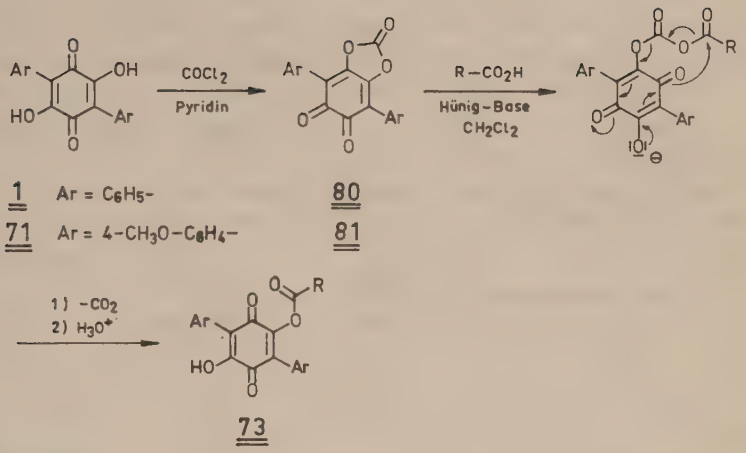


78 79

Schema 20.

Die durch Umsetzung von Polyporsäure (1) oder Atromentindimethylether (71) mit Phosgen/Pyridin zugänglichen cyclischen Carbonate 80 und 81 sollten analog reagieren (Schema 21).

Für die Reaktion von 80 und 81 mit den Carbonsäuren ist Pyridin (Acylierungskatalysator !) als Base nicht geeignet, da hierbei auch die diacylierten Produkte entstehen. Verwendet man aber N,N-Diisopropyl-ethylamin [107], so erhält man in guter Ausbeute die gewünschten monoacylierten Verbindungen (siehe Tabelle 8, Methode C). Zur Vervollständigung der Reaktion ist es allerdings notwendig, die Reaktionsmischung am Rückfluß zu kochen, da das Produkt sonst noch erhebliche Mengen nicht decarboxyliertes Zwischenprodukt (IR $\nu_{\overset{O}{\overset{\|}{OCO}}} \approx 1775\ cm^{-1}$) enthält.



1 Ar = C_6H_5- 80

71 Ar = 4-CH_3O-C_6H_4- 81

73

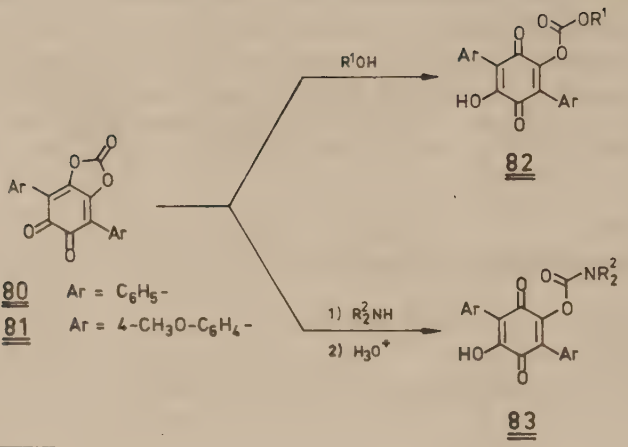
Schema 21.

Versuche, die monoacylierten Terphenylchinone über die "cyclischen Oxalate" [108,109] herzustellen, lieferten - wahrscheinlich wegen deren starker Hydrolyseempfindlichkeit - nur schlechte Ausbeuten.

5.4. Carbonate und Urethane von Terphenylchinonen

Mit den cyclischen Kohlensäureestern 80 und 81 lassen sich im Prinzip die gleichen Reaktionen durchführen wie mit 78 [106,109]. Die Reaktivität der Carbonylgruppe - erkennbar an der Lage der CO-Absorptionsbande im IR - sollte allerdings geringer sein als bei 78. Die Carbonyl-Absorptionsbande von 78 liegt bei 1895 cm^{-1} [106], die der Verbindungen 80 und 81 bei ca. 1870 cm^{-1}.

Durch Umsetzung mit überschüssigem Alkohol wurden die Carbonate 82 - es kann bei Raumtemperatur und ohne Zusatz von Acylierungsmitteln gearbeitet werden [109] - und durch Reaktion mit äquimolaren Mengen sekundärer Amine die Urethane 83 erhalten (Schema 22).



Schema 22.

Tabelle 9. Dargestellte Carbonate 82 und Urethane 83

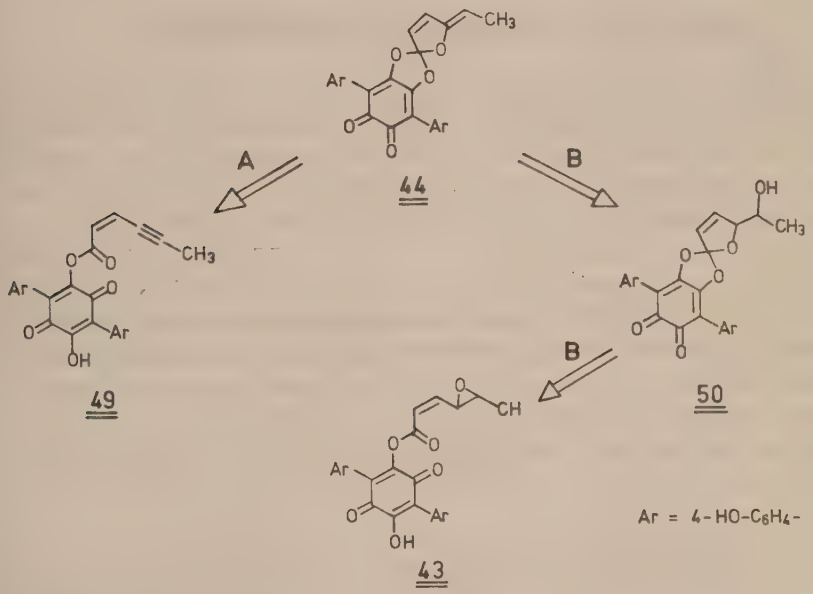
Nr.	R^1	R^2	Ar	Ausb. [%]
82a	CH_3-	-	4-CH_3O-C_6H_4-	74
82b	C_2H_5-	-	C_6H_5-	77
82c	C_2H_5-	-	4-CH_3O-C_6H_4-	80
83a	-	$(CH_3)_2$-	C_6H_5-	52
83b	-	$(CH_3)_2$-	4-CH_3O-C_6H_4-	70
83c	-	$(C_2H_5)_2$-	C_6H_5-	65
83d	-	$(C_2H_5)_2$-	4-CH_3O-C_6H_4-	68

Wie erste Vorversuche zeigen, lassen sich die (aktivierten) Urethane 83 mit primären Aminen unter schärferen Reaktionsbedingungen, analog den aus 78 hergestellten Urethanen [109], weiter zu Harnstoffen umsetzen.

5.5. Versuche zur biomimetischen Synthese von Violett-1

Die ungewöhnliche Konstitution (ortho-Chinon und Spiro-ortho-ester) von Violett-1 (44) und die geringe Menge des zur Verfügung stehenden Naturstoffes waren der Anlaß für den Versuch einer Synthese dieser interessanten Verbindung.

In Anlehnung an mögliche Biogenesen von 44 kommen für eine Synthese die in Schema 23 gezeigten beiden Möglichkeiten A und B in Frage.



Schema 23.

Da die Biogenese wahrscheinlich über das Epoxid 43 verläuft (siehe Kap.4.5., Schema 12), schien eine biomimetische Synthese von 44 über Weg B besonders reizvoll und erfolgversprechend zu sein.

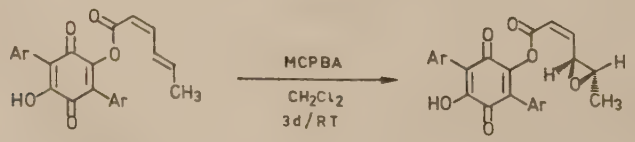
Die Synthese des für die Herstellung des Epoxids 43 notwendigen Ausgangsmaterials Orange-1 (38) bzw. der Derivate von Orange-1

wurde bereits in den vorhergehenden Kapiteln (5.2. und 5.3.2.) beschrieben. Größere Mengen an Orange-1 sind wegen der schlechten Zugänglichkeit des für die Synthese benötigten Atromentins (2) - das am besten durch Extraktion von *P.atrotomentosus* gewonnen wird - nicht erhältlich. Deshalb wurden die meisten der im nachfolgenden beschriebenen Versuche mit den Derivaten durchgeführt, die an den Arylresten keine OH-Gruppen tragen oder bei denen die OH-Gruppen als Methylether geschützt sind.

5.5.1. Herstellung der epoxidierten Sorbinoylderivate

Aus Untersuchungen von DYONG et al. [110] ist bekannt, daß mit Peressigsäure regiospezifisch die 4,5-Doppelbindung von Sorbinsäure(ester) epoxidiert wird. 2-cis-4-trans-Sorbinsäure liefert bei der Epoxidierung - durch Cyclisierung des primär gebildeten Epoxids - Osmundalacton (41) und dessen 5-Ring-Isomer [111].

Behandelt man Orange-1 (38) mit meta-Chlorperbenzoesäure (MCPBA), so erhält man ein Enantiomerengemisch des gewünschten threo-Epoxids 43 (Schema 24). 43 ist allerdings mit nichtepoxidiertem Ausgangsmaterial, dessen chromatographische Abtrennung Schwierigkeiten bereitet, verunreinigt. Die Bildung von bereits cyclisierten oder an der 2,3-Doppelbindung epoxidierten Produkten wird nicht beobachtet.



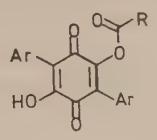
38 43

Ar = 4-HO-C6H4-

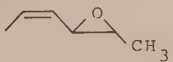
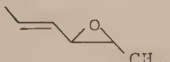
Schema 24.

Weitere epoxidierte Verbindungen, die aus Mono-sorbinoyl-Derivaten von Terphenylchinonen hergestellt wurden, sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10. Dargestellte Epoxide von Mono-sorbinoyl-terphenylchinonen



84

Nr.	R	Ar	Ausgangsmaterial	Ausb. %
84a		C_6H_5-	73a	72
84c	"	4-CH_3O-C_6H_4-	73c	73
84d		C_6H_5-	73d	71
84f	"	4-CH_3O-C_6H_4-	73f	46

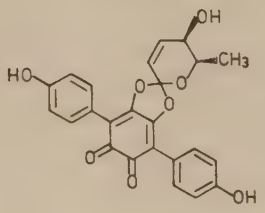
5.5.2. Cyclisierung zu den ortho-Chinonen

Für den nächsten Schritt, die Öffnung des Oxiran-Ringes der cis-konfigurierten Derivate 43 und 84a,c unter gleichzeitiger Cyclisierung zu den gewünschten ortho-Chinonen kommen basische oder saure Bedingungen in Frage.

Behandelt man eine Lösung von 43 in Dichlormethan mit Pyridin oder DBU, so wird keine Reaktion beobachtet. Ebenfalls erfolgt keine Cyclisierung bei der Zugabe von Essigsäure, Ameisensäure oder p-Toluolsulfonsäure. Mit BF_3-Etherat tritt innerhalb weniger Sekunden zunächst eine violette, dann eine dunkle und schließlich wieder eine helle Verfärbung der Lösung auf. Als Reaktions-

produkt läßt sich Atromentin (2) nachweisen. Bei der Zugabe von Trifluoressigsäure beobachtet man nach 1-2 Minuten eine violette Verfärbung, die nach ca. 15 Minuten wieder verschwindet. Stoppt man die Reaktion nach 8 Minuten durch Zugabe von festem Natriumhydrogencarbonat und extrahiert mit Essigester, so erhält man ein violett gefärbtes Rohprodukt, das durch Dünnschichtchromatographie in zwei violette Substanzen (R_F= 0.32 und 0.28) aufgetrennt werden kann.

Von der Substanz mit R_F= 0.32 konnte ein ^{1}H-NMR erhalten werden, dessen Signale für das Vorliegen des "6-Ring-Produktes" 85b sprechen.



85b

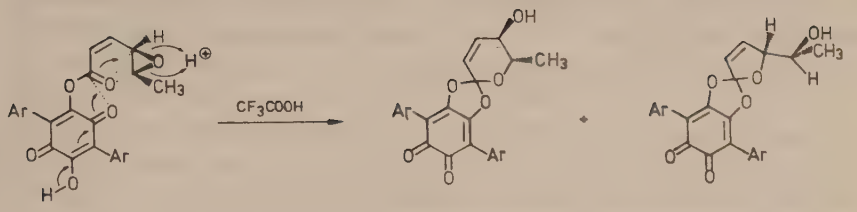
Die Substanz mit R_F= 0.28, die nur in geringer Menge erhalten wurde, lieferte kein aussagekräftiges NMR-Spektrum.

Die weiteren Untersuchungen wurden mit den besser zugänglichen Derivaten 84a und 84c durchgeführt.

Das Polyporsäurederivat 84a liefert mit TFA die rotgefärbten Phlebiarubronderivate 85a und 86a im Verhältnis von ungefähr 2:1 (Schema 25).

Bei der Behandlung von 84c mit TFA erhält man die violetten 6-Ring- und 5-Ring-Produkte 85c und 86c (Verhältnis 3:1). Versuche, durch Veränderung der Reaktionsbedingungen (Temperatur) das Verhältnis zugunsten von 86 zu verschieben, blieben erfolglos.

In geringer Menge wird aus 84c noch ein drittes violettes Produkt

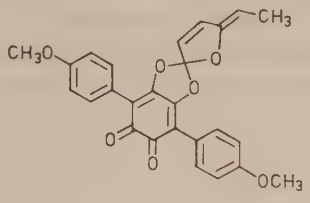


84a,c 85a,c 86a,c

84 - 86	Ar
a	C_6H_4-
c	4-CH_3O-C_6H_4-

Schema 25.

87c gebildet, das einen höheren R_F-Wert als die beiden Hauptprodukte besitzt. Wie die spektroskopischen Untersuchungen zeigen, handelt es sich hierbei um das durch Dehydratisierung von 86c entstandene, gewünschte Endprodukt.



87c

Die der exocyclischen Doppelbindung zugeordnete Z-Konfiguration ist allerdings noch unsicher, da wegen der geringen Menge des zur Verfügung stehenden Materials nur ein schlecht aufgelöstes ^{1}H-NMR erhalten wurde und die für die Konfigurationszuordnung notwendige Kopplungskonstante $J_{2,5}$ (siehe Kap. 4.5.) nicht bestimmt werden konnte.

87c ist im chromatographischen Verhalten identisch mit dem aus Violett-1 (44) durch Behandlung mit Diazomethan entstandenen methylierten Produkt.

Andere Cyclisierungsprodukte als die bereits erwähnten, wurden bei der Behandlung der Epoxide mit TFA nicht beobachtet.

Mit an Kieselgel adsorbiertem $FeCl_3$, einem für Dehydratisierungen empfohlenen und für Epoxid-Öffnungen geeigneten Reagenz [112], erhält man aus 84c zwar die cyclisierten Verbindungen 85c und 86c, aber nicht das erwartete dehydratisierte Produkt 87c.

Die "trans-Epoxide" 84d und 84f zeigen mit TFA bis auf die nach einiger Zeit erfolgende Bildung von Atromentin keine Reaktion. Auch bei gleichzeitiger Bestrahlung mit UV-Licht konnten keine cyclisierten Produkte erhalten werden.

5.5.3. Versuche zur Wasserabspaltung

Um von 86c zum gewünschten 87c zu kommen, ist noch ein Dehydratisierungsschritt (syn-Eliminierung) notwendig. Da bereits bei der Cyclisierung 87c gebildet wird, sollte diese letzte Stufe keine besonderen Schwierigkeiten bereiten.

Die bisher durchgeführten Dehydratisierungsversuche mit $POCl_3$/Pyridin und $SOCl_2$/Pyridin [113], $FeCl_3$/Kieselgel [112] und Erhitzen mit Al_2O_3/Akt.Stufe I blieben aber erfolglos. Bei den erwähnten Methoden wurde immer die Zerstörung des Moleküls unter Bildung von Atromentin beobachtet.

6. Spektroskopische Daten von Terphenylchinonderivaten

6.1. IR-Spektren von acylierten Terphenylchinonen

Mit Hilfe der IR-Daten eines acylierten Terphenylchinons läßt sich eine Aussage darüber machen, ob die OH-Gruppen am Chinonring frei vorliegen oder ob eine oder beide acyliert sind.

Beobachtet man im IR nur eine starke und breite Bande bei ~1610

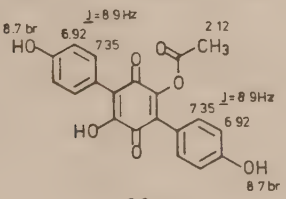
cm^{-1}, so ist dies ein Hinweis dafür, daß beide OH-Gruppen ungeschützt vorliegen. Bei monoacylierten Derivaten (auch bei Carbonaten und Urethanen) sind im Chinonbereich zwei, oft verbreiterte Banden bei ~1610 und ~1660 cm^{-1} zu sehen. Die diacylierten Verbindungen (beide Chinon-Hydroxy-Gruppen sind acyliert) zeigen drei Banden bei ~1610, ~1640 und ~1670 cm^{-1}.

Der 2Z,4E-Sorbinoylrest ist durch zwei zusammen auftretende Banden bei 945 (m) und 965 cm^{-1} (w) leicht zu erkennen.

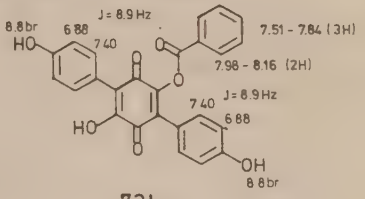
6.2. ^{1}H-NMR-Spektren von Terphenylchinonderivaten

In den nachfolgenden Tabellen 11-15 sind die ^{1}H-NMR-Daten einer Reihe von Terphenylchinonderivaten angegeben.

Bei einem großen Teil der monoacylierten Terphenylchinone, wie z.B. beim monoacetylierten 39 und monobenzoylierten Atromentin 73h, beobachtet man eine Äquivalenz der beiden aromatischen Terphenylchinonringe (nur ein AA'BB'-System erscheint im Spektrum), obwohl die Verbindungen unsymmetrisch aufgebaut sind.



39

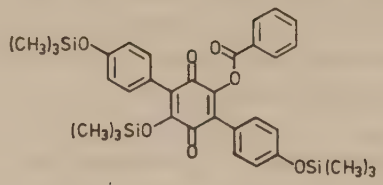


73h

Als Ursache für die Äquivalenz bei den acylierten Derivaten kommen Acylgruppenwanderungen in Frage, die zum Beispiel auch bei Enolestern verschiedener β-Diketone [115] und acylierten Tropolonen [114] beobachtet werden.

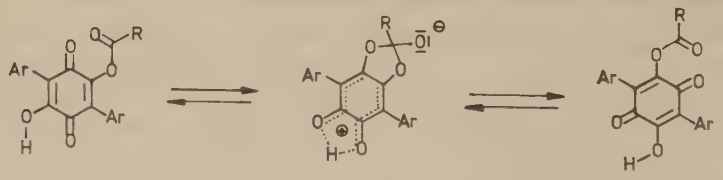
Im Spektrum des Atromentin-3-methylethers 45 (siehe Kap.9.2.) sind wie erwartet, zwei unterschiedliche AA'BB'-Systeme zu sehen. Das durch Behandlung von 73h mit BSA hergestellte silylierte Derivat 88h zeigt ebenfalls zwei getrennte AA'BB'-Systeme, die al-

lerdings zufälligerweise fast identische chemische Verschiebungen haben.



88h

Beim Abkühlen der NMR-Lösungen von 39 und 73h werden die bei Raumtemperatur scharfen Signale der jeweiligen AA'BB'-Systeme zunehmend breiter,und schließlich tritt eine Aufspaltung in jeweils zwei AA'BB'-Systeme auf. Die bei RT zusammenfallenden Signale der phenolischen Protonen (breites Singulett) werden beim Abkühlen ebenfalls aufgetrennt. Die Koaleszenstemperatur T_c liegt bei 39 zwischen -60 und -90°C, die der Verbindung 73h zwischen -40 und -55°C. Das Verhalten beim Abkühlen stützt die Vermutung, daß die symmetrischen Spektren der monoacylierten Terphenylchinone tatsächlich durch Acylgruppenwanderungen verursacht werden (Schema 26).



73 XII 73

Schema 26.

Die Koaleszenztemperatur bei ein und derselben Verbindung ist abhängig von der Polarität des Lösungsmittels - was wegen des stark polarisierten Charakters der Zwischenstufe XII auch erwartet wird - und von Verunreinigungen (Säure- oder Basenspuren) der untersuchten Substanz.

Inwieweit ein Säure- oder Basenzusatz die Acylwanderungen monoacylierter Terphenylchinone katalysiert [114a], müssen zukünftige

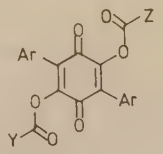
Untersuchungen zeigen.

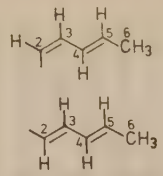
Ebenfalls kann erst durch weitere Untersuchungen, wie z.B. durch ein Kreuzungsexperiment [116], Aufklärung darüber erhalten werden, ob die Acylwanderungen, wie in Schema 26 formuliert, tatsächlich intramolekular verlaufen, oder ob ein intermolekularer Mechanismus vorliegt.

6.3. ^{13}C-NMR-Spektren von Terphenylchinonderivaten

Die ^{13}C-NMR-Spektren der monoacylierten Atromentinderivate 38, 39 und 73h (siehe Tabelle 16) sprechen ebenfalls für die schon bei den ^{1}H-NMR-Spektren diskutierten Acylwanderungen. Bei Raumtemperatur werden nur vier Signale eines aromatischen Ringes des Atromentingerüstes beobachtet. Die Signale des Chinon-Teils sind in den Spektren der monoacylierten Atromentinderivate, wahrscheinlich wegen einer zu starken Verbreiterung, nicht zu sehen. Dadurch sind in den Spektren der diacylierten und symmetrischen Derivate 74b und 74g mehr Signale sichtbar, als bei den entsprechenden "unsymmetrischen" monoacylierten Verbindungen.

Tabelle 11. ^{1}H-NMR-Daten der Sorbinoyl-Terphenylchinone (mono- und disubstituiert); δ-Werte, [ppm] [a]



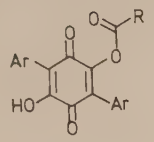


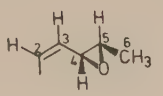
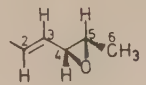
Ar^1 = C_6H_5-
Ar^2 = 4-HO-C_6H_4-
Ar = 4-CH_3O-C_6H_4-

Nr.	Y	Z	Ar	2-H	3-H	4-H	5-H	6-H	Aromatische Protonen AA'BB'-System [b]	"s"	Sonstige	Kopplungskonstanten J [Hz] 2,3	2,6	3,4	4,5	4,6	5,6
73a	H	R^1	Ar^1	dqm 5.67	dd 6.72	ddqd [c] 7.26	dq [c] 6.18	dm 1.86	-	7.45	-	11.0	0.7	11.5	14.8	1.5	6.8
74a	R^1	R^1	Ar^1	5.67	6.70	7.26	6.18	1.85	-	7.42	-	11.1	0.7	11.2	14.6	1.5	6.8
38	H	R^1	Ar^2	5.72	6.86	7.29	6.29	1.86	6.91, 1.35	-	-	11	0.7	11.3	14.6	1.5	6.8
74b	R^1	R^1	Ar^2	5.76	6.89	7.31	6.32	1.87	6.93, 7.31	-	-	11.0	0.7	11.3	14.6	1.5	6.8
73c	H	R^1	Ar^3	5.68	6.70	7.27	6.16	1.87	6,96, 7.51 und 6.96, 7.36	-	3.82 [d]	11.1	-	11.4	14.7	1.5	6.8
74c	R^1	R^1	Ar^3	5.68	6.70	7.27	6.16	1.87	6.92, 7.35	-	3.82 [d]	11.1	-	11.4	14.7	1.5	6.8
73d	H	R^2	Ar^1	d 5.83	dd [c] 7.35	m 6.0-6.45		d 1.86	-	7.43	-	15	-	10	? [e]	? [e]	5
74d	R^2	R^2	Ar^1	5.83	7.34	6.0-6.45		1.85	-	7.39	-	15	-	10	? [e]	? [e]	5
73e	H	R^2	Ar^2	5.93	7.37	6.1-6.55		1.85	6.89, 7.33 br.	-	-	15	-	10	? [e]	? [e]	5
74e	R^2	R^2	Ar^2	5.96	7.39	6.1-6.55		1.86	6.91, 7.27	-	-	15	-	10	? [e]	? [e]	5
73f	H	R^2	Ar^3	5.86	7.39	6.0-6.45		1.87	6.96, 7.51 und 6.96, 7.36	-	3.83 [d]	15	-	10	? [e]	? [e]	5
74f	R^2	R^2	Ar^3	5.87	7.36	6.1-6.45		1.86	6.92, 7.34	-	3.82 [d]	15	-	10	? [e]	? [e]	5

a) Lösungsmittel $CDCl_3$; bei 38, 74b, 73e und 74e [D_6]Aceton. Temp. 25-30°C. b) J= 8.9 Hz. c) Signale teilweise verdeckt.
d) Jeweils (s; 6H, $-OCH_3$). e) Nicht bestimmbar.

Tabelle 12. ^{1}H-NMR-Daten von D,L-(4,5-Epoxy-sorbinoyl)-Terphenylchinonderivaten; δ-Werte, [ppm]



84 ; R^1 =  ; R^2 =  ;

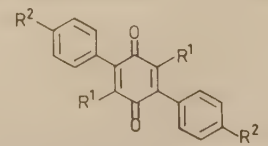
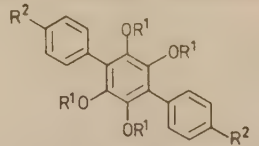
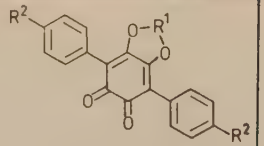
Ar^1 = C_6H_5-
Ar^2 = 4-HO-C_6H_4-
Ar^3 = 4-CH_3O-C_6H_4-

Nr.	R	Ar	2-H	3-H	4-H	5-H	6-H	Aromatische Protonen AA'BB'-System (J)	"s"	Sonstige	Kopplungskonstanten J [Hz] 2,3	2,4	3,4	4,5	5,6	Lösungsmittel
84a	R^1	Ar^1	6.08 dd	5.96 dd	4.08 ddd	2.95 qd	1.35 d	-	7.46	-	11.4	0.5	6.7	2.0	5.1	$CDCl_3$
84b[a]	R^1	Ar^2	6.19 dd	6.02 dd	4.03 ddd	3.01 qd	1.29 d	6.91, 7.36 (9 Hz)	-	-	11.8	-	7	2	5	[D_6]Aceton
84c	R^1	Ar^3	6.11 d	5.98 dd	4.12 dd	2.97 qd	1.36 d	6.98, 7.38 br. (8.9) 6.98, 7.49 br. (8.9)	-	3.85 [b]	11.6	-	7.0	2.0	5.1	$CDCl_3$
84c	R^1	Ar^3	6.18 d	6.06 dd	4.04 dd	3.02 qd	1.30 d	7.02, 7.45 (9 Hz)	-	3.86 [b]	11.6	-	7.2	2	5	[D_6]Aceton
84d	R^2	Ar^1	6.19 dd	6.84 dd	3.16 ddd	2.94 qd	1.37 d	-	7.44	-	15.6	0.6	6.5	2.0	5.1	$CDCl_3$
84f	R^2	Ar^3	6.22 dd	6.88 dd	3.20 dd	2.98 qd	1.38 d	6.96 (8.9; 4 H), 7.24-7.64 br.	-	3.85 [b]	15.8	0.6	6.5	2.0	5.1	$CDCl_3$

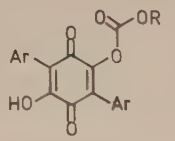
a) = 43 . b) Jeweils (s; 6H, $-OCH_3$).

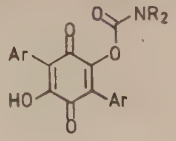
Tabelle 13. ^{1}H-NMR-Daten einiger einfacher, symmetrisch substituierter Terphenylchinonderivate

δ-Werte, [ppm]

Typ I  ; Typ II  ; Typ III 

Nr.	Typ	R^1	R^2	Aromatische Protonen R^1	Aromatische Protonen R^2	Aromatische Protonen AA'BB'-System (J)	Aromatische Protonen "s" oder m	Lösungsmittel
74k	I	Ac-	H-	2.24	-	-	7.31-7.56	$CDCl_3$
2	I	H-	HO-	-	9.5 br.	6.76, 7.20 (8.7 Hz)	-	$[D_6]$DMSO
74g	I	Ac-	HO-	2.24	-	6.94, 7.27 (8.9 Hz)	-	$[D_6]$Aceton
89	I	Ac-	AcO-	2.25	2.33	7.20, 7.40 (9 Hz)	-	$CDCl_3$
71	I	H-	CH_3O-	-	3.76	6.93, 7.30 (8.7 Hz)	-	$[D_6]$DMSO
90	I	CH_3-	CH_3O-	3.83	3.86	6.98, 7.33 (9 Hz)	-	$CDCl_3$
91	I	Ac-	CH_3O-	2.24	3.85	6.97, 7.33 (9 Hz)	-	$CDCl_3$
32	II	Ac-	H-	1.94	-	-	7.38	$CDCl_3$
34	II	Ac-	AcO-	1.96	2.31	7.13, 7.33 (8.8 Hz)	-	$CDCl_3$
80	III	-CO-	H-	-	-	-	7.38-7.75	$CDCl_3$
81	III	-CO-	CH_3O-	-	3.86	6.99, 7.62 (8.6 Hz)	-	$CDCl_3$
7	III	$-CH_2$-	H-	6.12	-	-	7.31-7.73	$CDCl_3$
46	III	$-CH_2$-	HO-	6.24	9.6 br.	6.82, 7.41 (8.7 Hz)	-	$[D_6]$DMSO

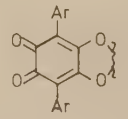
82 = 

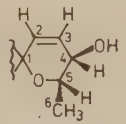
; 83 = 

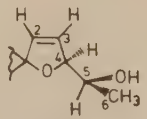
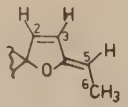
Nr.	R	Ar	R	Aromatische Protonen AA'BB'-System (J)	"s" oder m	Sonstige	Lösungsmittel
82a	CH_3-	4-CH_3O-C_6H_4-	3.86 (s)	6.98, 7.38 br. [a] (8.9 Hz); 6.98, 7.51 br. [a] (8.9 Hz)	-	3.85	$CDCl_3$
82b	C_2H_5-	C_6H_5-	1.31 (t, J= 7 Hz); 4.27 (q, J= 7 Hz)	-	7.3-7.6	-	$CDCl_3$
82c	C_2H_5-	4-CH_3O-C_6H_4-	1.32 (t, J= 7 Hz); 4.27 (q, J= 7 Hz)	6.96 [b], 7.38 (8.8 Hz); 6.97 [b], 7.49 (8.8 Hz)	-	3.84 3.85	$CDCl_3$
83a	CH_3-	C_6H_5-	2.94 (s); 2.96 (s)	-	7.3-7.6	-	$CDCl_3$
83b	CH_3-	4-CH_3O-C_6H_4-	2.96 (s); 2.99 (s)	6.95 [b], 7.40 (9 Hz); 6.97 [b], 7.49 (9 Hz)	-	3.83 3.85	$CDCl_3$
83c	C_2H_5-	C_6H_5-	1.07, 1.1 (jew. t, J= 7 Hz); 3.28 (br. q, J= 7 Hz)	-	7.3-7.6	-	$CDCl_3$
83d	C_2H_5-	4-CH_3O-C_6H_4-	1.10, 1.13 (jew. t, J= 7 Hz); 3.28 (br. q, J= 7 Hz)	6.95 [b], 7.39 (9 Hz); 6.96 [b], 7.49 (9 Hz)	-	3.82 3.84	$CDCl_3$

a) Verbreiterung durch Acylgruppenwanderung bedingt. b) Signale austauschbar.

Tabelle 15. ^{1}H-NMR-Daten der in Kapitel 5.5.2. beschriebenen ortho-chinoiden Verbindungen; δ-Werte, [ppm]





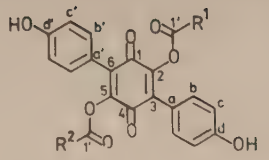
85 ;  86 ;  87

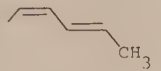
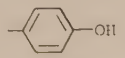
Nr. c)	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	aromat.Protonen	Sonstige
85a a)	br., d 5.83 (J= 10 Hz)	br., d 6.43 (J= 10 Hz)	m 4.14		d 1.46 (J= 6 Hz)	m 7.3-7.52 (6H) m 7.52-7.72 (4H)	-
85c b)	dd 6.09 (J= 10.2 + 1.8 Hz)	dd 6.52 (J= 10.2 + 0.7 Hz)	m 4.11		d 1.40 (J= 6 Hz)	7.00, 7.59 (4H) d) 7.00, 7.62 (4H) d)	s, 3.84
86a a)	dd 6.03 (J= 5.8 + 2.1 Hz)	dd 6.71 (J= 5.8 + 1.35 Hz)	ddd 5.06 (J=4.2,2.1+1.4Hz)	m 3.87-4.25	d 1.29 (J=6.2Hz)	m 7.30-7.50 (6H) m 7.50-7.73 (4H)	-
86c b)	dd 6.32 (J= 5.9 + 2.3 Hz)	~7.0 (verdeckt)	ddd 5.05 (J=5.4,2.3+1.5Hz)	m 4.2	d 1.24 (J= 6 Hz)	6.99, 7.63 (4H) 6.99, 7.60 (4H) d)	s, 3.84
87c a)	br., d 6.02 (J= 5.5 Hz)	d 6.66 (J= 5.5 Hz)	-	br., q 5.04 (J= 7.2 Hz)	d 1.82 (J=7.2Hz)	6.96, 7.64 (8H) e)	s, 3.84
87c b)	br., d 6.47 (J= 5.5 Hz)	~7.0 (verdeckt)	-	br., q 5.18 (J= 7 Hz)	d 1.76 (J= 7 Hz)	7.01, 7.61 (8H)	s, 3.84

a) Lösungsmittel $CDCl_3$. b) Lösungsmittel [D_6]Aceton. c) Verbindungsnummern mit a: Ar= C_6H_5-; Verbindungsnummern mit c: Ar= 4-CH_3O-C_6H_4-. d) AA'BB'-System, J= p Hz. e) AA'BB'-System, J= 8.9 Hz.

Tabelle 16. ^{13}C-NMR-Daten einiger acylierter Atromentinderivate

δ-Werte, [ppm] [a]



Nr.	R^1	R^2	1,4	2,5	3,6	a,a'	b,b'	c,c'	d,d'	Sonstige Signale
38		-H	-	-	-	121.35	132.81	115.62	158.86	18.80 (C-6'), 113.45 (C-2'), 129.05 (C-4'), 143.55 (C-5'), 149.54 (C-3'), 164.11 (C-1')
74b	"	R^1	180.68	148.18	134.20	120.54	132.71	115.94	159.70	18.65 (C-6'), 113.19 (C-2'), 129.05 (C-4'), 143.97 (C-5'), 149.93 (C-3'), 163.98 (C-1')
39	$-CH_3$	-H	-	-	-	121.32	132.81	115.68	158.89	20.36 ($-CH_3$), 169.12 (C-1')
74g	$-CH_3$	$-CH_3$	180.84	148.12	134.12	120.34	132.70	116.00	159.77	20.26 ($-CH_3$), 168.93 (C-1')
73h		-H	-	-	-	121.28	132.90	115.68	158.93	129.28 (C-2'), 129.85 (C-3') [b], 131.06 (C-4') [b], 135.14 (C-5')

[a] Alle Spektren in [D_6]Aceton. [b] Signale austauschbar.

EXPERIMENTELLER TEIL

7. Geräte und Materialien

Die Spektren wurden an folgenden Geräten aufgenommen:

UV: Model 25 Spectrophotometer (Beckman), Cary 17 und Cary 219 Spectrophotometer (Varian).

CD: Circulardichrograph III (Jouan-Roussel) bei 20°C.

IR: SP 1100 Infrared Spectrometer (Pye Unicam). Angegeben wurden die Wellenzahlen [cm^{-1}]. Die Bandenintensitäten wurden wie folgt gekennzeichnet: sst= sehr stark, st= stark, m= mittel, w= schwach, sh= Schulter.

^{1}H-NMR: EM 390 (Continous wave, 90 MHz, Varian), WH 90 (Fourier transform, 90 MHz, Bruker). Angegeben wurden die δ-Werte in [ppm] (TMS als innerer Standard) und die Kopplungskonstanten in [Hz]. Multiplizitäten: s= Singulett, d= Dublett, t= Triplett, q= Quartett, m= Multiplett.

^{13}C-NMR: WP 80 (20.0 MHz, Bruker), WH 90 (22.628 MHz, Bruker). Die Signallagen (TMS als innerer Standard) wurden durch Breitbandentkopplung (BB) bestimmt. Vergleichsmessungen bei ^{13}C-Biogeneseuntersuchungen wurden im BB-Modus unter identischen Bedingungen durchgeführt. Die Gehaltsbestimmung von ^{13}C-angereicherten Substanzen erfolgte über die Integrale der entsprechenden Signale.

MS: MS 30 und MS 50 mit DS 50 Data-System (A.E.I.) und MS 9 (A.E.I.). Die Aufnahmen erfolgten im Direkteinlaß bei 70 eV Ionisierungsenergie. Ionenquellentemperaturen wurden angegeben. Die Messungen der ^{13}C-angereicherten Substanzen wurden am MS 9 unter low-voltage-Bedingungen durchgeführt. Um gleiche Aufnahmebedingungen zu gewährleisten, wurden die Spektren von zu vergleichenden Substanzen nacheinander aufgenommen. Für die Berechnungen wurden die aus 5 Spektren gemittelten Intensitäten des M^{+}-Bereiches eingesetzt.

Massenfeinbestimmungen wurden mit dem MS 50 durchgeführt. Das Auflösungsvermögen betrug $1.5 \cdot 10^4$ (10% Tal-Definition).

Optische Drehwerte: Perkin Elmer 241 Polarimeter.

Schmelzpunkte wurden mit einem Büchi SMP-20 und einem Reichert Thermovar bestimmt und sind nicht korrigiert.

^{14}C-Aktivitätsbestimmungen: Flüssigkeitsscintillationszähler BF 820 (Labor Prof. Berthold, Wildbad). Die Zählausbeute (82% in ungelöschten Proben) wurde nach der Methode des externen Standards bestimmt. Quenchkorrekturen erfolgten automatisch über ein Rechnersystem (HP 9815, Hewlett-Packard). Die zu messenden Substanzen (5 mg) wurden - bei 1 mußte erwärmt werden - in 5 ml Dioxan gelöst. Von dieser Lösung wurden 100 µl (≙ 100 µg) in 4 ml Flüssigkeitsscintillationslösung (bestehend aus: 830 ml Dioxan, 170 ml Ethylenglycolmonomethylether, 50 g Naphthalin, 10 g PPO und 0.5 g POPOP) in Polyethylen-Fläschchen gemessen.

Verbrennungsanalysen wurden im Mikroanalytischen Labor des Instituts für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn durchgeführt.

Säulenchromatographie: MN-Kieselgel 60 (0.1-0.2 mm) und MN-Polyamid SC 6-AC (Macherey-Nagel & Co., Düren)+) sowie Sephadex LH 20 (Pharmacia, Uppsala, Schweden).

+) Während der Durchführung der Arbeit traten bei Chromatographieversuchen an MN-Polyamid SC 6-AC oft große Substanzverluste auf, bzw. wertvolle Substanzen gingen vollständig verloren. Wie erst später festgestellt wurde, lag dies an unzureichend acetyliertem Polyamid. Vor Verwendung von Polyamid SC 6-AC muß deshalb dessen Acetylierungsgrad unbedingt überprüft werden. Hierzu empfiehlt sich ein von OERTEL [118] ausgearbeitetes, einfaches Verfahren:
Eine Spatelspitze (10-20 mg) des zu prüfenden Polyamids, einige Körnchen Ninhydrin und 2-3 ml Wasser werden in einem Reagenzglas eine Minute aufgekocht. Sind jetzt nur einige Partikel des Polyamids blau gefärbt, kann es für chromatographische Trennungen von polaren Substanzen verwendet werden. Ist aber die Gesamtmenge des Polyamids blau, so muß von einer Verwendung abgeraten werden.

Analytische Dünnschichtchromatographie: DC-Alufolien Kieselgel 60 F_{254} (Merck, Darmstadt)
Laufmittel, wenn nicht anders angegeben: Benzol/Ameisensäureethylester/Ameisensäure = 10:5:3 (Laufmittel 1053).

Präparative Dünnschichtchromatographie: Kieselgel 60 (Merck, Darmstadt), DC-Fertigplatten Sil G-200 UV_{254} (Macherey-Nagel & Co., Düren).

8. Biogeneseuntersuchungen

8.1. Verfütterungen von markiertem Phenylalanin an Fruchtkörper von *Hapalopilus nidulans*

8.1.1. Verfütterung von ^{13}C-Phenylalanin (Versuch T1)

Der Versuch wurde 1978 in einem Wald bei Rheinbach durchgeführt. Zwei auf einem Eichenstamm wachsende Fruchtkörper von *H.nidulans* wurden zweimal im Abstand von 3 Tagen mit einer wäßrigen Lösung von insgesamt 100 mg DL-[3'-^{13}C]Phenylalanin (31*) [119] geimpft. Nach 15 Tagen wurden die Pilze geerntet und gefriergetrocknet (8.5 g).

Zur Aufarbeitung wurden die Fruchtkörper in einer Universalmühle zerkleinert und mehrmals mit 3%iger Ammoniaklösung extrahiert. Aus dem ammoniakalischen Extrakt fiel nach Zugabe von verdünnter Salzsäure Polyporsäure (1) aus, die durch Zentrifugation abgetrennt, mit Wasser gewaschen und getrocknet wurde (3.2 g). Ein Teil des Rohproduktes wurde durch Umkristallisation aus Dioxan gereinigt.
Ausbeute 1 rein: 26% bez. auf Trockenmasse (≙ 2.2 g); Schmp. 317-318°C (Lit. [6]: 310-312°C).

Im MS und ^{13}C-NMR von 1 und im MS des mit Zn/Ac_2O/DMAP hergestellten Tetraleukoacetats 32 [Schmp. 265-266°C (Lit. [120]: 267-268°C)] konnte keine Erhöhung des natürlichen ^{13}C-Gehaltes festgestellt

werden.

^{13}C-NMR (D_6, ^{12}C]DMSO, 10 mg/ml): δ= 115.56 (C-3), 127.37 (4'), 127.53 (3' oder 2'), 130.38 (2' oder 3'), 130.77 (1'), 168.1 (breit; 1,2)

8.1.2. Verfütterung von ^{14}C-Phenylalanin (Versuch T2)

Insgesamt 45 µCi einer wäßrigen Lösung von L-[u-^{14}C]Phenylalanin (spez. Akt. 531 mCi/mmol, 50 µCi/ml, Reinheit nach Herstellerangabe: >98%, Amersham Buchler, Braunschweig) wurden mit einer Spritze auf die Oberfläche und in mehrere Stellen eines auf einem vermoderten Eichenast wachsenden Fruchtkörpers von *H.nidulans* appliziert. Einzelheiten zur Verfütterung sind in Tabelle 17 angegeben.

Tabelle 17. Verfütterung von ^{14}C-Phenylalanin an *H.nidulans*

Versuchstag	Größe des Fruchtkörpers [cm]	Applizierte Menge ^{14}C-Phenylalanin [µCi] / [ml]
1	7.0 x 5.0	25 / 0.5
5	7.2 x 5.3	20 / 0.4
12	7.3 x 5.5	-

Nach 12 Tagen wurde der Fruchtkörper geerntet und gefriergetrocknet (4.75 g). Die Aufarbeitung erfolgte wie beim vorangegangenen Versuch.
Ausbeute 1 rein: 22% bez. auf Trockenmasse; Schmp. 316-317°C (Lit. [6]: 310-312°C).
Die spez. Aktivität [+)] der isolierten Polyporsäure (1) (2.14 nCi/µmol) blieb auch nach zwei weiteren Umkristallisationen (2.11 und 2.18 nCi/µmol), einer Umfällung (2.11 nCi/µmol) und einer Überführung mit Zn/Ac_2O/DMAP in das Tetraleukoacetat 32 (2.34 nCi/

[+)] Herrn Dr. M.PETER danke ich für die Hilfe bei der Durchführung der Aktivitätsbestimmungen.

µmol) innerhalb der Fehlergrenzen konstant.

8.2. Verfütterungen von ^{13}C-markierten Aminosäuren an Fruchtkörper von *Paxillus atrotomentosus* (Versuche T3 und T4)

Die Versuche wurden im September/Oktober 1977 im Dreieichforst bei Frankfurt/Main durchgeführt.
Bei Versuch T3 wurde eine wäßrige Lösung von DL-[3'-^{13}C]Phenylalanin-NH_4-Salz (31a*), bei Versuch T4 eine Lösung von DL-[3'-^{13}C]-Tyrosin (33*) mit Hilfe einer Spritze in Stiel und Hut eines Fruchtkörpers appliziert. Die einzelnen Verfütterungsdaten sind in Tabelle 18 angegeben.

Tabelle 18. Verfütterung von ^{13}C-Aminosäuren an jeweils einen Fruchtkörper von *P.atrotomentosus*

	Versuch T3 Phe-Impfung	Versuch T4 Tyr-Impfung
Verfütterte Gesamtmenge an markierter Aminosäure (mmol)	0.66	0.22 [a] (2 x 0.11)
Volumen der Lösung (ml)	6	20
Trockenmasse Fruchtkörper (g)	13.5	8.6
Verfütterte Menge (mmol)/ Trockenmasse (g)	0.049	0.026
Verfütterungsdauer	1 Woche	2 Wochen
Ø des Fruchtkörperhutes (cm) am Anfang/Ende des Versuchs	4.5/10.0	8.5/12.5
Isolierte Menge Atromentin (mg)/(mmol)	148/0.457	97/0.299
Atromentingehalt (%; bez. auf Trockenmasse Pilz)	1.1	1.1

[a] Die zu verfütternde Menge Tyrosin wurde halbiert und im Abstand von einer Woche geimpft. Bei einem vorangegangenen Versuch, bei dem eine größere Menge Tyrosin (0.77 mmol) auf einmal geimpft wurde, trat Wachstumshemmung und Zerfall des Pilzes ein.

Bei beiden Versuchen erfolgte die Aufarbeitung des Pilzes und Isolierung des Atromentins (2) nach folgender Vorschrift:

Der gefriergetrocknete Fruchtkörper wurde in einer Universalmühle fein zermahlen, in einer Soxhlet-Apparatur mit Petrolether 40/60 entfettet und mit Aceton extrahiert (48 h). Der nach dem Eindampfen des Aceton-Extraktes erhaltene Rückstand wurde in ca. 10 ml 1N Natronlauge aufgenommen und filtriert. Aus dem Filtrat wurde mit verdünnter Salzsäure das Atromentin ausgefällt, abzentrifugiert, mit Wasser gewaschen und bei 90°C i.Vak. getrocknet. Das Rohprodukt wurde zur Analyse zweimal aus Dioxan umkristallisiert. Schmp. >310°C.

Zur massenspektrometrischen Gehaltsbestimmung wurde durch reduktive Acetylierung mit Zn/Ac_2O/DMAP das Hexaleukoacetat 34 [8b] hergestellt. Die Bestimmung der Anreicherung erfolgte am (M^+-CH_2CO)- und $(M^+-2\ CH_2CO)$-Peak.

8.3. Verfütterungen ^{13}C-markierter Verbindungen an Fruchtkörper von *Suillus grevillei*, *S.granulatus* und *S.luteus* (Versuche G1-G7)

Geimpft wurden DL-[3'-^{13}C]Phenylalanin (31*) (Versuch G1), DL-[3'-^{13}C]Tyrosin (33*) (Versuch G2) und ^{13}C-Grevillin A (10*) (Versuche G3-G7); alle Verbindungen mit einer Anreicherung von 90 Atom-%. Die Versuche wurden - wenn nicht anders angegeben - im Sommer 1976 und 1977 in einer Lärchenschonung bei Vischel/Altenahr/Eifel durchgeführt. Nach Verfütterung der Vorläufer wurden die Pilze nach 3 d geerntet und aufgearbeitet. Einzelne Daten zu den verschiedenen Verfütterungsversuchen sind in Tabelle 19 angegeben.

Zur Aufarbeitung wurden die Pilze zunächst gefriergetrocknet und in einer Universalmühle zerkleinert. Nach Entfettung mit Petrolether 40/60 wurde mehrmals mit Methanol, dem einige Tropfen konz. Salzsäure zugesetzt waren, extrahiert. Die methanolische Phase wurde am Rotationsverdampfer eingeengt, die dabei ausfallende Fumarsäure abfiltriert und der nach dem Eindampfen erhaltene Rückstand zwischen verdünnter Salzsäure und Essigester verteilt. Nach dem Trocknen der Essigesterphase über Natriumsulfat wurde i.Vak.

Tabelle 19. Verfütterungen ^{13}C-markierter Verbindungen an Grevilline-produzierende Pilze

Versuch	Pilz	Vorläufer verfütterte Gesamtmenge [mg]/[mmol]	Anzahl Pilze	Art der Applikation	Trockenmasse Pilz [g]	[mmol] Vorläufer / [g] Pilz	isolierte Grevilline
G1	*Suillus grevillei*	^{13}C-Phenylalanin 150 / 0.9	10	Impfung als wäßrige Lösung mit Spritze und Glastubus	14.9	0.061	A,B,C
G2	*Suillus grevillei*	^{13}C-Tyrosin 90 / 0.5	6	Impfung als wäßrige Suspension mit Spritze	5.6	0.088	A,B,C
G3 a)	*Suillus grevillei*	^{13}C-Grevillin A 215 / 0.66	10	Impfung als wäßrige Suspension mit Spritze	16.8	0.039	A,B,C
G4	*Suillus grevillei*	^{13}C-Grevillin A 90 / 0.28	6	Impfung als wäßrige Lösung/30 ml/mit Glastubus	6.8	0.040	A,B,C
G5	*Suillus grevillei*	^{13}C-Grevillin A 200 / 0.62	5	Impfung als Lösung in DMSO/1 ml/mit Spritze	7.2	0.085	A,B,C
G6 a)	*Suillus granulatus*	^{13}C-Grevillin A 110 / 0.34	8	Impfung als wäßrige Suspension mit Spritze	22	0.015	A,D
G7 b)	*Suillus luteus*	^{13}C-Grevillin A 50 / 0.15	3	Impfung als wäßrige Lösung/15 ml mit Spritze	-	-	A,D

a) Impfungen wurden von H.BESL in Regensburg durchgeführt. Nach den Impfungen vermindertes Wachstum durch trockenes Wetter.

b) Standort der Pilze: Kottenforst bei Werthhoven.

eingedampft und der Rückstand durch Chromatographie an Polyamid AC (10 cm Säule) vorgereinigt. Dazu wurden zunächst die lipophilen Bestandteile mit Dichlormethan und anschließend Essigester eluiert. Durch Chromatographie mit Aceton, dem steigende Mengen Methanol zugesetzt wurden, konnten die Grevilline erhalten werden. Die endgültige Auftrennung erfolgte durch präparative DC an Kieselgel-Platten mit Laufmittel 1053. Die einzelnen Grevillinzonen wurden von der noch feuchten Platte abgelöst, mit verd. Salzsäure und Essigester etwa 10 Minuten verrührt, das Kieselgel über einen Büchner-Trichter abgesaugt und aus dem Filtrat die Essigesterphase abgetrennt. Nach dem Waschen mit Wasser wurde getrocknet, eingedampft und der Rückstand über eine "Mini-Säule" (Pasteur-Pipette mit Polyamid AC) mit Aceton/Methanol = 80:20 chromatographiert.

Bei fast allen Aufarbeitungen an *Suillus*-Pilzen traten wegen ungenügend acetyliertem Polyamid starke Ausbeuteverluste auf. Die Grevilline wurden teilweise nur in Spuren erhalten.

8.4. Verfütterungen ^{13}C-markierter Verbindungen an Fruchtkörper von *Boletus erythropus* und *Boletinus cavipes* (Versuche P1-P4)

Geimpft wurden Verbindungen mit einer Anreicherung von 90 Atom-%. Die Daten zu den einzelnen Verfütterungen sind in Tabelle 20 angegeben.

Die Isolierung der Hydroxy-pulvinsäuren aus den geimpften Pilzen erfolgte nach folgender Vorschrift:
Bei den Versuchen P1, P2 und P4 wurden die frischen Pilze in einem Mixer unter Methanol, dem etwas Ascorbinsäure und einige Tropfen konz. Salzsäure zugesetzt waren, zerkleinert. Dann wurde abgesaugt und der Rückstand noch 2mal mit Methanol extrahiert. Bei Versuch P3 wurden die gefriergetrockneten Pilze extrahiert. Die Methanol-Extrakte wurden weitgehend eingedampft, der Rückstand zwischen Essigester und Wasser verteilt, die organische Phase über Na_2SO_4 getrocknet und i.Vak. eingedampft. Das zurückbleibende Material wurde an Polyamid AC mit Aceton/Methanol = 1:1 chromatographiert.

Tabelle 20. Verfütterungen ^{13}C-markierter Verbindungen an Hydroxypulvinsäuren-produzierende Pilze

Versuch	Pilz	Vorläufer verfütterte Gesamtmenge [mg] / [mmol]	Anzahl Pilze	Art der Applikation	Dauer Tage	Ø Pilzhut [cm] . Anfang/Ende	Trocken-masse Pilz [g]	isolierte Variegat-säure [mg]
P1 a)	*Boletus erythropus*	^{13}C-Phenyl-alanin 60 / 0.36	1	Impfung als wäßrige Lösung (6 ml) mit Spritze	4	10/15	-	72
P2 a)	*Boletus erythropus*	^{13}C-Phenyl-alanin-NH_4-salz 280 / 1.53	2	Pro Pilz Impfung von 20 mg in 2 ml Wasser, 7 Tage hintereinander täglich	8	4/15	-	99
P3 b)	*Boletinus cavipes*	^{13}C-Tyrosin 95 / 0.52		Impfung als wäßrige Suspension in den hohlen Stiel	-	-	17	3 d)
P4 c)	*Boletus erythropus*	^{13}C-Atromen-tinsäure 90 / 0.26	1	Impfung einer wäßrigen Lösung von 45 mg in 10 ml, nach 2 Tagen Wiederholung	4	8.5/10.5	ca. 9	70 e)

a) Standort der Pilze: Kottenforst/Bad Godesberg, Versuch P1 1976, Versuch P2 1977.
b) Impfung wurde 1976 von H.BESL in Schneckenbach/Krs. Regensburg durchgeführt.
c) Standort des Pilzes: Kottenforst/Bonn-Röttgen 1979.
d) Zusätzlich wurden noch 2 mg Xerocomsäure (17) isoliert.
e) Zusätzlich wurden noch 2.8 mg Atromentinsäure (16), 3.2 mg (Xerocomsäure (17) und eine Spur Variegatorubin (20) erhalten.

Der Vorlauf enthielt Xerocomsäure (17) [bei P4 auch Atromentinsäure (16)] und Variegatsäure (18), dann wurde reine 18 und schließlich Variegatorubin (20) isoliert. Der Vorlauf bei den Versuchen P3 und P4 wurde durch präparative DC (Laufmittel 1053) weiter aufgetrennt.

8.5. Verfütterungen ^{13}C-markierter Verbindungen an Kulturen von *Serpula lacrymans* und *Hygrophoropsis aurantiaca* (Versuche P5-P8)

Die Verfütterungen und Isolierung der Rohpigmente wurden von H.BESL und A.BRESINSKY am Botanischen Institut der Universität Regensburg durchgeführt.

Serpula lacrymans:
2 Erlenmeyerkolben (1 l) wurden mit je 250 ml Nährmedium (Moser b flüssig), 50 mg ^{13}C-Grevillin A (10*) (Versuch P5) bzw. 50 mg DL-[3'-^{13}C]Tyrosin (33*) (Versuch P6) und etwas Watte versetzt. Nach dem Sterilisieren und Beimpfen mit *Serpula lacrymans*-Mycel erfolgte achtwöchige Kultur bei Raumtemperatur und normalem Hell-Dunkel-Wechsel.

Die auf übliche Weise gewonnenen Rohpigmente wurden dünnschichtchromatographisch getrennt und an Sephadex LH-20 mit Aceton gereinigt.

Vor der MS-Messung wurden die Verbindungen noch einmal an Polyamid AC ("Mini-Säule") mit zunächst CH_2Cl_2 und schließlich mit Aceton/Methanol = 1:1 chromatographiert.

Hygrophoropsis aurantiaca:
Das Mycel wurde auf 150 ml Flüssig-Nährmedium unter Zusatz von 200 mg DL-[3'-^{13}C]Phenylalanin (31*) (Versuch P7) bzw. 127 mg ^{13}C-Grevillin A (10*) (Versuch P8) kultiviert. Nach 9 Wochen Kulturdauer wurde bei Versuch P7 Variegatsäuremethylester (37) und bei Versuch P8 Variegatorubin (20) durch Kombination von SC

und DC isoliert.

Die Nachreinigung der Substanzen erfolgte an Polyamid AC wie beim vorangegangenen Versuch.

9. Isolierung und Charakterisierung von Pilzinhaltsstoffen

9.1. Monoacylierte Atromentinderivate Orange-1 bis Orange-4

Die monoacylierten Atromentinderivate wurden von BESL und BRESINSKY [68] aus verschiedenen Paxillaceae-Pilzen wie folgt isoliert:
Tiefgefrorene Fruchtkörper von *Paxillus panuoides* wurden mit Aceton extrahiert, der nach dem Einengen des Aceton-Extraktes erhaltene Rückstand zwischen Essigester und Wasser verteilt und die eingedampfte Essigesterphase durch Chromatographie an Sephadex LH 20/Aceton vorgetrennt. Durch Oxidation des Eluats mit $K_3[Fe(CN)_6]/NaHCO_3$-Lösung und anschließende Auftrennung durch Säulenchromatographie an Sephadex LH 20/Aceton und Dünnschichtchromatographie (Laufmittel 1053) wurden Orange-1 (38), Orange-2 (39) und Orange-3 (40) erhalten.

Aus tiefgefrorenen Fruchtkörpern von *P.panuoides* var. *ionipus* wurde analog Orange-4 (43) und aus getrockneten Fruchtkörpern von *P.atrotomentosus* Orange-1 (38) isoliert.

Orange-2 (39) wurde auch aus Mycelkulturen von *Omphalotus olearius* erhalten.

Vor den analytischen Untersuchungen wurden die einzelnen Pigmente auf eine Polyamid AC Säule ("Mini-Säule") gegeben, dann mit Dichlormethan entfettet und schließlich mit Aceton eluiert.

Orange-1 (38)

Orange-braune Kriställchen, die sich oberhalb 150°C ohne definierten Schmelzpunkt zersetzen. In einer geschmolzenen Probe von 38 konnte dünnschichtchromatographisch Atromentin (2) und diacyliertes Produkt 74b oder 74e nachgewiesen werden.

DC (Laufmittel 1053): R_F= 0.48, orangefarbener Fleck, der beim Behandeln mit NH_3-Dämpfen violett wird.

IR (KBr): 3430 (br, st), 1730 (br, m), 1650 (br, sst), 1610 (sst), 1592 (sh), 1517, 1440, 1370, 1315, 1271, 1188, 1110, 1080, 1006, 947, 860, 836, 800 cm^{-1}.

^{1}H-NMR ([D_6]Aceton): δ= 1.85 (dm, J= 6.8 Hz; 3H), 5.72 (dqm, J= 11.1 + 0.7 Hz; 1H), 6.29 (dq, J= 14.6 + 6.8 Hz; 1H), 6.86 (dd, J= 11.3 + 11.1 Hz; 1H), 7.29 (ddqd, J= 14.6, 11.3, 1.5 + 0.5 Hz; 1H, teilw. verdeckt), 6.91, 7.35 (AA'BB'-System, J= 8.9 Hz; 8H).

MS (DE 120°C): m/e= 514 (2%), 512 (0.5), 420 (0.3, M^++2), 417.1047 (0.8, ber. für $C_{24}H_{18}O_7$ 418.1053, M^+), 324.0641 (79, $C_{18}H_{12}O_6$, 324.0633), 296 (19), 134 (21), 133 (10), 95.0495 (100, C_6H_7O, 95.0497), 67.0550 (42, C_5H_7, 67.0548).

Orange-2 (39)

Orange-rote Kristalle, beim Erhitzen tritt Zersetzung unter Bildung von Atromentin (2) und diacetyliertem Produkt 74g ein.

DC (Laufmittel 1053): R_F= 0.32, orangefarbiger Fleck, der beim Behandeln mit NH_3-Dämpfen violett wird.

IR (KBr): 3400 (br, sst), 3250 (sh), 2960 (sh), 1758 (st), 1677 (m), 1630 (st), 1608 (sst), 1588, 1517, 1432, 1372, 1312, 1290, 1262, 1220, 1190, 1110, 1028, 1000, 850 cm^{-1}.

^{1}H-NMR ([D_6]Aceton): δ= 2.22 (s; 3H), 6.92, 7.35 (AA'BB'-System, J= 8.9 Hz; 8H).

MS (DE 180°C): m/e= 408 (2%), 368 (3, M^++2), 366.0732 (18, ber. für $C_{20}H_{14}O_7$ 366.0740, M^+), 324 (100), 296 (28), 134 (25), 133 (12), 43 (16).

Orange-3 (40)

DC (Laufmittel 1053): R_F= 0.28, orangefarbiger Fleck, der sich mit NH_3-Dämpfen violett verfärbt.

^{1}H-NMR ([D_6]Aceton): δ= 1.18 (d, J= 6.4 Hz; 3H), ~4.8 (m; 1H), 5.51 (dd, J= 10.3 + 4.1 Hz; 1H), 6.16 (dd, J= 11.5 + 0.5 Hz), 6.59 (dd, J= 11.5 + 10.3 Hz; 1H), 6.92, 7.36 (AA'BB'-System, J= 8.9 Hz; 8H).

40 ist mit etwa der doppelten molaren Menge 41 verunreinigt. ^{1}H-NMR-Signale von 41: δ= 1.49 (d, J= 6.4 Hz; 3H), ~4.8 (m; 2H), 6.06 (dd, J= 9.9 + 1.4 Hz; 1H), ~7.0 (verdeckt; 1H).

Orange-4 (43)

DC (Laufmittel 1053): R_F= 0.47, orangefarbiger Fleck, der sich mit NH_3-Dämpfen violett verfärbt.

^{1}H-NMR ([D_6]Aceton): δ= ~1.3 (verdeckt), 2.98 (qd, J= 5 + 2 Hz; 1H), 4.08 (dd, J= 7.5 + 2 Hz; 1H), 5.91 (dd, J= 11.6 + 7.5 Hz; 1H), 6.13 (d, J= 11.6 Hz; 1H), 6.78, 7.38 (AA'BB'-System, J= 9 Hz; 8H).

9.2. Violett-1 (44)

Das Pigment wurde von BESL und BRESINSKY [68] aus Mycelkulturen von *P.panouides* (flüssiges Nährmedium, Moser b) durch Behandeln mit angesäuertem Aceton und Essigesterextraktion gewonnen. Die Reinigung erfolgte nach Vortrennung an Sephadex LH 20/Methanol durch Säulenchromatographie an Sephadex LH 20/Aceton.
Insgesamt wurden aus 12 l Flüssigkultur 15 mg (noch verunreinigtes) Violett-1 (44) erhalten.

Schmp. (Mikroskop): Bei 170°C verschwindet die violette Farbe; Kristalle werden gebildet, die bei 240°C in eine braun gefärbte

Substanz übergehen. Bis 320°C kein Schmelzen der braunen Substanz zu beobachten.

UV (Ethanol; siehe auch Abb.4): λ_{max} = 268 nm (lg ε = 4.51), 382 (3.15), 550 (3.54).

IR (KBr): 3390 (br., sst), 1670 (m), 1630 (sh), 1608 (sst), 1588, 1512, 1445, 1355, 1278, 1250, 1192, 1145, 1055, 1030, 990, 945, 838, 818, 780 cm^{-1}.

^{1}H-NMR ([D_6]Aceton): δ= 1.76 (dd, J= 7.2 + 0.6 Hz; 3H), 5.16 (qdd, J= 7.2, 0.6 + 0.3 Hz; 1H), 6.44 (ddq, J= 5.5, 0.6 + 0.6 Hz; 1H), 6.96 (dd, J= 5.5 + 0.3 Hz; 1H), 6.88, 7.50 (AA'BB'-System, J= 8.8 Hz; 8H), 8.65 (s, br.; 2H).

MS (DE 180°C): m/e= 418.1055 (7%, ber. für $C_{24}H_{18}O_7$ 418.1053, M^++2), 416.0896 (1, $C_{24}H_{16}O_7$, 416.0896, M^+), 390 (4), 388 (1), 324 (82), 296 (25), 145 (44), 134 (59), 133 (26), 110 (64), 107 (35), 105 (44), 82 (82), 69 (100).

3,6-Bis(4-hydroxyphenyl)-5-hydroxy-2-methoxy-1,4-benzochinon (45) = Atromentin-3-methylether

45 entsteht bei der Chromatographie von 44 an Sephadex LH 20 mit Methanol und wird als erstes Produkt von der Säule eluiert.

DC (Laufmittel 1053): R_F= 0.32, orangefarbiger Fleck, der sich mit NH_3-Dämpfen violett verfärbt.

^{1}H-NMR ([D_6]Aceton): δ= 3.90 (s; 3H), 6.88 [+)], 7.27 (AA'BB'-System, J= 8.9 Hz; 4H), 6.90 [+)], 7.38 (AA'BB'-System, J= 8.9 Hz; 4H).

MS (DE 150°C): m/e= 340 (72%, M^++2), 338 (46, M^+), 325 (9), 324 (8), 323 (6), 310 (23), 307 (61), 295 (30).

45 ist identisch mit einem nach KÖGL und BECKER [8c)] hergestellten Produkt.

+) Signale austauschbar.

4,7-Bis(4-hydroxyphenyl)-1,3-benzodioxol-5,6-dion (46)
= 4',4"-Dihydroxy-phlebiarubron

162 mg (0.5 mmol) Atromentin (2) in 50 ml abs. Aceton, 553 mg (4 mmol) Kaliumcarbonat (trocken) und 440 mg (4 mmol) Methylensulfat [121] wurden 3 Tage bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wurde abfiltriert, das Filtrat i.Vak. eingedampft, der Rückstand aus Dioxan umkristallisiert und bei 70°C i.Vak. getrocknet.

Ausbeute: 78 mg (46%); Schmp.: >300°C.

UV (Ethanol, siehe auch Abb.3): λ_{max} = 277 nm (lgε = 4.53), 388 (3.15), 540 (3.54).

^{1}H-NMR ([D_6]DMSO): δ= 6.24 (s; 2H, -O-CH_2-O-), 6.82, 7.41 (AA'BB'-System, J= 8.7 Hz; 8H), 9.63 (s, breit; 2H, -OH).

MS (DE 180°C): m/e= 338.0789 (19%, ber. für $C_{19}H_{14}O_6$ 338.0790, M^++2), 336.0632 (6, $C_{19}H_{12}O_6$, 336.0634, M^+), 326 (15), 324 (100), 296 (23), 189 (15), 145 (22), 134 (36), 107 (17), 105 (30).

9.3. Rubin-1 (51)

51 wurde von BESL und BRESINSKY [68] aus Mycelkulturen von *Serpula lacrymans* isoliert und ist in der Reihe der aus *S.lacrymans* isolierten Rubine dasjenige mit dem größten R_F-Wert (0.50).

^{1}H-NMR ([D_6]Aceton): δ= 3.96 (s; 3H), 6.87 (s; 1H), 7.40 (s; 1H), 6.96, 8.08 (AA'BB'-System, J= 9 Hz; 4H), 8.7 (s, breit; 2H, OH).

MS (DE 160°C): m/e= 368.0529 (100%, ber. für $C_{19}H_{12}O_8$ 368.0532, M^+), 207 (23), 206 (63), 179 (12), 161 (24), 151 (11), 134 (59), 133 (44), 105 (52), 77 (32).

9.4. Pigmente aus *Boletus morissii*

- Pigmente aus dem Pilzhut 18 und 20:

Eine kleine Probe aus einem getrockneten Pilzhut von *B.morissii* wurde mit Methanol, dem ein Tropfen konz. Salzsäure zugesetzt war, extrahiert. Der nach dem Eindampfen erhaltene Rückstand wurde zwischen Essigester und verd. Salzsäure verteilt, die org. Phase über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i.Vak. abgedampft.

Das DC (Laufmittel 1053) zeigt drei farbige Substanzen: R_F= 0.29, rot, in R_F-Wert, Farbe und Verhalten gegenüber konz. H_2SO_4 (hellblaue Verfärbung) identisch mit Variegatorubin (20);
R_F= 0.13, gelb, in R_F-Wert, Farbe und Verhalten gegenüber $K_3[Fe(CN)_6]/NaHCO_3$-Lösung (blaue Verfärbung) identisch mit Variegatsäure (18);
R_F= 0.01, gelb, besteht aus mehreren Substanzen.

- Pigmente aus dem Pilzfuß 52

0.71 g getrocknete und zerkleinerte Pilzfüße wurden analog vorstehender Vorschrift aufgearbeitet. Das DC (Laufmittel 1053) zeigt - neben 18 und 20 - hauptsächlich das Substanzgemisch bei R_F= 0.01.
Durch mehrmalige Chromatographie an Sephadex LH 20/Methanol konnte eine der polaren Substanzen (52) angereichert werden (0.55 mg).

UV (Methanol, qualitativ): λ_{max}= 258 nm, 371.

$[\alpha]_D^{20}$= +96° (± 10; c= 50 mg/100 ml).

^{1}H-NMR (CD_3OD): Multipletts [+)] bei δ= 2.0 (2H), 2.2 (1H), 3.6-3.8 (ca. 6H), 3.9-4.5 (ca. 6-8H), 5.2-5.3 (ca. 2H), 5.8-5.9 (ca. 2H); aromatische Protonen bei δ= 6.64 (dd, J= 8.1 + 1.8 Hz; 1H), 6.78 (d, J= 1.8 Hz; 1H), 6.79 (d, J= 8.1 Hz; 1H), 7.19 (d, J= 8.5 Hz; 1H), 7.68 (dd, J= 8.5 + 2.0 Hz; 1H), 7.85 (d, J= 2.0 Hz; 1H).

+) Es wurden alle Signale, die im Spektrum auftreten, angegeben. Nicht ganz auszuschließen ist, daß einige der Signale durch Verunreinigungen verursacht werden.

0.5 mg 52 wurden mit 10proz. Schwefelsäure aufgekocht und die Lösung mit Essigester extrahiert. In der Essigesterphase konnten dünnschichtchromatographisch Variegatsäure (18) und typische Variegatsäure-Zersetzungsprodukte nachgewiesen werden. Versuche, in der wäßrigen Phase nach Ausfällen des Sulfats mit Ba^{2+} weitere Hydrolyseprodukte nachzuweisen, schlugen fehl.

9.5. Aufarbeitung von *Suillus americanus* 53

Der methanolische Extrakt von ca. 10 unter Methanol aufbewahrten Exemplaren von *S.americanus* wurde i.Vak. weitgehend eingedampft und das sich dabei abscheidende ölige Produkt vom wäßrigen Rückstand durch Filtration abgetrennt. Nach Zusatz von konz. Salzsäure zur wäßrigen Phase wurde mit Essigester ausgeschüttelt, die org. Phase über Magnesiumsulfat getrocknet und einrotiert. Durch Chromatographie an Sephadex LH 20/Methanol konnte eine Farbstoff-Fraktion erhalten werden, in der 53 angereichert war. Bei einem weiteren Chromatographieversuch dieser Fraktion trat vollständige Zersetzung von 53 ein.

DC von 53 (Laufmittel 1053): R_F= 0.09, gelb, unterhalb von Grevillin D, mit konz. H_2SO_4 rote Verfärbung (reversibel).

9.6. Pigmente aus *Boletus retipes* 54 und *Boletus ornatipes* 55

- *Boletus retipes* 54

16 g getrocknete Fruchtkörper von *B.retipes* wurden zunächst mit Petrolether 40/60 entfettet und anschließend mit Essigester extrahiert. Aus dem eingedampften Essigesterextrakt konnte durch Säulenchromatographie an Polyamid AC mit Aceton und Sephadex LH 20 mit Aceton eine schwach verunreinigte Substanz 54 (ca. 10 mg) abgetrennt werden.

DC (Laufmittel 1053): R_F= 0.36, fast farblos, mit NH_3-Dämpfen intensiv gelbe Verfärbung.

Beim Stehenlassen in methanolischer Lösung zersetzt sich 54, und es entsteht ein Hauptfleck bei R_F= 0.44.

IR (KBr): 3450 (br., st), 2940 (m), 2860 (sh), 1790 (sst), 1732 (sst), 1691 (sst), 1650 (st), 1591, 1520, 1500, 1432, 1368, 1270, 1208, 1195, 1160, 1110, 1030, 1010, 980, 920, 875, 840, 750, 735 cm^{-1}.

UV (Acetonitril, 1.48 mg/5 ml, siehe auch Abb.5): λ_{max}= 223 nm (lg ε = 4.15), 275 (3.58, sh), 319 (3.71), 395 (3.46, sh), 434 (3.59).

+HCl: 223 (4.15), 275 (3.58), 321 (3.74), 390 (3.16), 435 (3.27).

+NaOH: 242 (4.00), 300 (3.63), 333 (3.60), 3.83 (3.86).

^{1}H-NMR (270 MHz, [D_5]Aceton)$^{++}$: δ= 2.62 (dd, J= 4.5 + 4.5 Hz; 1H) $^{+}$, 2.64 (dd, J= 17 + 4.5 Hz; 1H) $^{+}$, 2.87 (m; 1H, teilw. verdeckt vom H_2O-Signal des Lsgm). $^{+}$, 3.30 (br., dt, J= 19 + 4.5 Hz; 1H), 3.34 (d, J= 13.5 Hz; 1H), 3.45 (br., dt, J= 19 + 4.5 Hz; 1H), 3.93 (d, J= 13.5 Hz; 1H), 4.03 (ddd, J= 11.1, 4.5 + 2 Hz; 1H), 4.17 (dd, J= 11.1 + 11 Hz; 1H), 4.87 (dd, J= 2.1 + 0.6 Hz; 1H), 6.53 (dd, J= 8.1 +2.1 Hz; 1H), 6.59 (br., s; 1H), 6.72 (d, J= 8.1 Hz; 1H), 7.03 (dd, J= 8.4 + 2.4 Hz; 1H), 7.26 (dd, J= 8.4 + 2.4 Hz; 1H), 7.36 (dd, J= 8.4 + 2.3 Hz; 1H), 7.69 (dd, J= 8.4 + 2.3 Hz; 1H), 7.95 (br., s; 1H).

MS (DE 150°C): m/e= 476.1101 (1%, ber. für $C_{26}H_{20}O_9$ 476.1107), 474 (0.8, M^+), 458 (14), 457 (4), 448 (0.5), 432.1223 (8, $C_{25}H_{20}O_7$, 432.1209), 430 (3), 414 (10), 412 (1.5), 336 (5), 384.1003 (8, $C_{24}H_{16}O_5$, 384.0998), 368 (6), 227 (19), 226 (41), 225.0918 (100, $C_{15}H_{13}O_2$, 225.0915), 120 (30), 107 (45), 91 (33), 65 (9).

Bei der Aufarbeitung von in Methanol eingelegten Fruchtkörpern konnte 54 nicht mehr erhalten werden.

$^{+}$) Angegebene Werte noch unsicher.

$^{++}$) Siehe auch Abb.6.

- *Boletus ornatipes* 55

20 g Herbarexemplare von *B.ornatipes* (teilw. schon ziemlich schwarz verfärbt) wurden analog der vorher angegebenen Vorschrift aufgearbeitet und zwei Fraktionen isoliert.

Fraktion 1: 55

DC (Laufmittel 1053): R_F= 0.38, fast farblos, mit NH_3 intensiv gelbe Verfärbung.

^{1}H-NMR (270 MHz, [D_6]Aceton, siehe auch Abb.6): δ= 2.57 (dd, J= 4.5 + 4.5 Hz; 1H) +), 2.61 (dd, J= 17 + 4.5 Hz; 1H) +), 2.87 (dd, J= 17 + 10.5 Hz; 1H), 3.24 dt, J= 19.5 + 4.5 Hz; 1H), 3.29 (d, J= 13.6 Hz; 1H), 3.49 (dt, J= 19.5 + 5 Hz; 1H), 3.97 (d, J= 13.6 Hz; 1H), 4.00 (br., d, J= 11 Hz; 1H), 4.15 (dd, J= 11+10.5 Hz; 1H), 4.86 (br., d, J= 1.8 Hz, 1H), 6.52 (dd, J= 8.1 + 1.8 Hz; 1H), 6.73 (d, J= 8.1 Hz; 1H), 7.01 (dd, J= 8.4 + 2.4 Hz; 1H), 7.27 (dd, J= 8.4 + 2.4 Hz; 1H), 7.37 (dd, J= 8.4 + 2.2 Hz; 1H), 7.70 (dd, J= 8.4 + 2.2 Hz; 1H), 8.16 (s; 1H).

Fraktion 2: Gemisch aus 54 und einer unbekannten Substanz.

9.7. Diarylcyclopentandione aus *Gyrodon lividus*

Die Substanzen wurden von BESL und BRESINSKY [68] aus dem acetonischen Extrakt des Pilzes durch Säulenchromatographie an Sephadex LH 20 mit Aceton, Methanol bzw. Methanol/Wasser (7:3) erhalten [82].

Die Messungen wurden mit bei 50°C/1 Torr getrockneten Substanzen durchgeführt und beziehen sich auf die Summenformeln x H_2O.

Zum Vergleich wurden auch einige neu gemessene Daten einer authentischen Probe von (+)-Chamonixin aus *Chamonixia caespitosa* [39] mit angegeben.

+) Angegebene Werte noch unsicher.

(-)-Chamonixin (29)

Blaß-cremefarbige Kristalle, oberhalb 140°C Gasentwicklung und allmähliche Zersetzung. (+)-Chamonixin zeigt das gleiche Verhalten.

$[\alpha]_D^{20}$= -28.7°(c=1, in 96% Ethanol) [(+)-Chamonixin: +31.9° (c=1, in 96% Ethanol)].

UV (Methanol): λ_{max}= 276 nm (sh, lg ε = 4.14), 252 (4.29), 225 (4.27).

CD (Methanol, 20°C, siehe auch Abb.7, S.69): 345 nm ($\Delta\varepsilon$= 0), 304 (+4.75), 279 (0), 252 (-6.62).

^{1}H-NMR ([D_6]Aceton): δ= 4.02, 4.81 (jeweils d, J= 7 Hz; 2 x 1H), 6.76, 7.00 (AA'BB'-System, J= 8.9 Hz; 4H, Ring B) und 6.85, 7.93 (AA'BB'-System, J= 8.9 Hz; 4H, Ring A).

MS (DE 180°C): m/e= 298.0843 (0.3%, ber. für $C_{17}H_{14}O_5$ 298,0841, M^+), 296.0681 (0.8, $C_{17}H_{12}O_5$, 296.0685, M^+-H_2), 280.0742 (100, 280.0736, M^+-H_2O), 252 (9), 224 (12), 223 (10), 147 (30), 134 (53).

$C_{17}H_{14}O_2 \times H_2O$	Ber. C 64.55	H 5.10
(316.3)	Gef. C 64.03	H 4.90

Involutin (30)

Blaßgelbe Kristalle, oberhalb 110°C Gasentwicklung und allmähliche Zersetzung.

$[\alpha]_D^{20}$= -18.7° (c=1, in 96% Ethanol).

UV (Methanol): λ_{max}= 279 nm (lg ε = 4.10), 254 (4.18), 200 (4.73)

CD (Methanol, 20°C, siehe auch Abb.7, S.69): 350 nm ($\Delta\varepsilon$= 0), 300.5 (+4.68), 293.5 (+4.97), 279 (0), 250 (-6.50).

^{1}H-NMR ([D_6]Aceton): δ= 3.97, 4.77 (jeweils d, J= 7 Hz; 2 x 1H), 6.54 (dd, J= 8.1 + 1.9 Hz; 1H), 6.63 (d, J= 1.9Hz;1H), 6.75 (d, J= 8.1 Hz; 1H), 6.86, 7.95 (AA'BB'-System, J= 8.9 Hz; 4H).

MS (DE 180°C): m/e= 314 (<0.1%, M^+), 312.0602 (1.2%, ber. für $C_{17}H_{12}O_6$ 312.0634, M^+-H_2), 296 (100), 268 (8), 240 (9), 239 (7),

163 (33), 134 (53).

$C_{17}H_{14}O_7 \times H_2O$	Ber. C 61.44	H 4.85
(332.3)	Gef. C 59.31	H 4.69

9.8. Acetat eines gelben Pigmentes aus *Cordyceps ophioglossoides* (56)

Schmp. 234-236°C (Mikroskop), hellgelbe Kristalle.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ= 2.03 (d, J= 0.7 Hz; 3H), 2.34 (s; 3H), 2.40 (s; 3H), 2.42 (d, J= 0.7 Hz; 3H), 6.83 (d, J= 2.2 Hz; 1H), 7.13 (d, J= 0.3 Hz; 1H), 7.40 (dd, J= 2.2 + 0.3 Hz; 1H), 15.01 (s; 1H).

MS (DE 200°C): m/e= 356.0914 (28%, ber. für $C_{19}H_{16}O_7$ 356.0896, M^+), 314 (76, M^+-CH_2CO), 273 (47, $M^+-C_4H_7CO$), 272 (100, $M^+-2\ CH_2CO$), 243 (28), 189 (10), 43 (30).

9.9. Pigmente aus *Oudemansiella badia* (Quel)Mos. 57 und 58

Ein Rohextrakt, der von BESL und BRESINSKY [68] aus Mycelkulturen von *O.badia* gewonnen wurde, wurde zur Abtrennung von fettähnlichen Bestandteilen zunächst über eine kurze Kieselgelsäule mit Dichlormethan filtriert. Das Filtrat wurde eingedampft und der Rückstand aus Hexan/Essigester umkristallisiert. Das DC (Laufmittel CH_2Cl_2) des Kristallisats zeigt mehrere gelbe Substanzen, von denen diejenige mit R_F= 0.82 durch zweimalige Säulenchromatographie (Kieselgel/CH_2Cl_2) abgetrennt werden konnte.

Schmp. 143-153°C (Zers.), orangegelbe Kriställchen, die sich - auch bei Aufbewahrung im Gefrierschrank - langsam zersetzen.

DC (Laufmittel CH_2Cl_2): R_F= 0.82, gelb, mit konz. H_2SO_4 dunkelblaue bis schwarze Verfärbung.

UV (0.25 mg/100 ml Methanol) 400 nm (E= 0.71), 412 (0.74).

IR (KBr): 2220 (sh, w), 1772 (sst), 1748 (sst), 1630, 1530, 1335, 1320, 1103, 1074, 992, 940, 880, 858, 845, 820, 765, 670 cm^{-1}.

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): Das Spektrum zeigt deutlich, daß zwei Substanzen (57 und 58) im Verhältnis 2:1 vorhanden sind.

57: δ= 0.99 (t, J= 7.5 Hz; 3H), 1.57 (tq, J= 7 + 7.5 Hz; 2H), 2.32 (td, J= 7 + 1.2 Hz; 2H), 5.69 (br., d, J= 15.5 Hz; 1H), 5.88 (br., d, J= 11.8 Hz; 1H), 6.17 (dd, J= 5.5 + <1 Hz; 1H), 6.37-6.54 (m; 3H), 6.74 (dd, J= 15.5 + 10.5 Hz; 1H), 6.80 (dd, J= 14.5 + 11.8 Hz; 1H), 7.35 (d, J= 5.5 Hz; 1H).

58: δ= 1.83 (dd, J= 6.8 + 1.8 Hz; 3H), 5.60 (dqd, J= 15.8, 8.1 + 1.0 Hz; 1H), 5.75 (br., d, J= 15.5 Hz; 1H), 5.88 (br., d, J= 11.8 Hz; 1H), 6.17 (dd, J= 5.5 + <1 Hz; 1H), 6.33 (dq, J= 15.8 +6.8 Hz; 1H), 6.37-6.54 (m, 3H), 6.76 (dd, J= 15.5 + 10.5 Hz; 1H), 6.81 (dd, J= 14.5 + 11.8 Hz; 1H), 7.35 (d, J= 5.5 Hz; 1H).

MS (DE 180°C): 57 m/e= 264.1144 (ber. für $C_{18}H_{16}O_2$ 264.1151, M^+); 58 m/e= 262.0987 (ber. für $C_{18}H_{14}O_2$ 262.0993).

In einem von T.ANKE [122] durchgeführten Plattendiffusionstest zeigt das Substanzgemisch 57+58 keine wachstumshemmende Wirkung gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien und gegen Pilze.

10. Synthesen

10.1. ^{13}C-markierte Verbindungen

[carboxy-^{13}C]Benzoesäure (59a*)

Eine Grignardlösung aus 1.57 g (15 mmol) Brombenzol, 0.37 g (15 mmol) Magnesiumspänen und 15 ml abs. Diethylether wurde nach der von WEYGAND und SIMON [123] beschriebenen Arbeitsweise mit [^{13}C]Kohlendioxid, das aus 1.98 g (10 mmol) Barium[^{13}C]-carbonat (90% ^{13}C; Sharp & Dohme GmbH, München) und 20 ml konz.

Schwefelsäure entwickelt wurde, umgesetzt. Nach beendeter Reaktion wurde mit Eis und Salzsäure zersetzt, die etherische Schicht abgetrennt und die wäßrige Phase noch 3mal mit Ether ausgeschüttelt. Die vereinigten Extrakte wurden mit Kochsalzlösung gewaschen und mit gesättigter $NaHCO_3$-Lösung extrahiert. Aus dem wäßrig-alkalischen Extrakt wurde durch Zugabe von Salzsäure die Benzoesäure 59a* ausgefällt, abgesaugt, gewaschen und getrocknet. Durch Extraktion mit Ether konnte aus dem Filtrat noch weiteres Produkt gewonnen werden.

Ausbeute: 1.16 g (94%); Schmp. 122.5°C (Lit.[124] nichtmarkiertes Produkt 122-123°C).

^{13}C-Gehalt: 90% (massenspektrometrisch bestimmt).

4-Methoxy-[carboxy-^{13}C]benzoesäure (59b*)

Analog der bei 59a* angegebenen Vorschrift wurde eine Grignardlösung aus 2.06 g (11 mmol) 4-Bromanisol, 0.27 g (11 mmol) Magnesiumspänen und 15 ml abs. Ether mit 10 mmol [^{13}C]Kohlendioxid (90% ^{13}C) umgesetzt und aufgearbeitet. Die isolierte Saäure 59b* wurde durch Sublimation (80°C/0.2 Torr) gereinigt.

Ausbeute: 1.04 g (68%); Schmp. 184°C (Lit.[124] nichtmarkiertes Produkt 182-185°C).

^{13}C-Gehalt: 90% (massenspektrometrisch bestimmt).

[α-^{13}C]Benzylalkohol (60a*)

2.29 g (18.6 mmol) [^{13}C]Benzoesäure 59a*, 2.15 ml (30 mmol) Thionylchlorid und ein Tropfen DMF wurden 30 Minuten am Rückfluß gekocht. Anschließend wurde das überschüssige Thionylchlorid vorsichtig i.Vak. entfernt und das zurückbleibende Säurechlorid (2.50 g; 17.6 mmol) tropfenweise mit einem Gemisch aus 4.05 ml (0.1 mol) abs. Methanol und 1.44 ml (17.6 mmol) Pyridin versetzt. Es wurde noch 2 Stunden am Rückfluß erhitzt, die Reaktionsmischung eingedampft und der Rückstand in Ether aufgenommen. Die etherische Phase wurde mit verdünnter Salzsäure und gesättigter $NaHCO_3$-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und einrotiert. Der erhaltene Methylester (2.20 g; 16.1 mmol) wurde in 10

ml abs. Ether gelöst und unter Eiskühlung zu einer Suspension von 0.5 g (13 mmol) $LiAlH_4$ in 20 ml abs. Ether getropft. Über Nacht wurde bei Raumtemperatur gerührt und anschließend durch tropfenweise Zugabe von gesättigter Natriumsulfatlösung zersetzt. Nach Zugabe von festem Natriumsulfat wurde abgesaugt, mit Ether gewaschen und das Filtrat vorsichtig eingedampft.

Ausbeute: 1.73 g (85% bezogen auf 59a*).

4-Methoxy-[α-^{13}C]benzylalkohol (60b*)

4.13 g (27 mmol) [^{13}C]Anissäure 59b* in 10 ml abs. Benzol, 3.25 ml (45 mmol) Thionylchlorid und ein Tropfen DMF wurden eine Stunde am Rückfluß gekocht. Das nach dem Eindampfen i.Vak. erhaltene Säurechlorid (4.63 g) konnte mit 4.05 ml (0.1 mol) abs. Methanol und 2.18 ml (27 mmol) Pyridin analog 60a* zum Methylester umgesetzt werden. Der Methylester (4.47 g) wurde in 10 ml abs. Ether aufgenommen und mit 0.61 g (16 mmol) $LiAlH_4$ in 20 ml abs. Ether reduziert. Nachgerührt wurde eine Stunde bei 30°C und aufgearbeitet wie bei 60a* beschrieben.

Ausbeute: 3.62 g (97% bezogen auf 59b*).

[α-^{13}C]Benzylbromid (61a*)

Zu einer eisgekühlten Lösung von 1.73 g (15.9 mmol) 60a* in 20 ml abs. Ether wurden zunächst einige Tropfen Pyridin gegeben und anschließend eine Lösung von 0.52 ml (5.5 mmol) Phosphortribromid in 5 ml abs. Ether zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt, dann abgekühlt und nacheinander mit eiskaltem Wasser und eiskalter gesättigter $NaHCO_3$-Lösung gewaschen. Die etherische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und anschließend eingedampft.

Ausbeute: 2.52 g (92%).

4-Methoxy-[α-^{13}C]benzylbromid (61b*)

2.78 g (20 mmol) 60b* in 20 ml abs. Ether wurden wie bei 61a* beschrieben mit 0.67 ml (7 mmol) Phosphortribromid in 10 ml abs. Ether umgesetzt und aufgearbeitet.

Ausbeute: 3.75 g (93%).

[α-^{13}C]Benzyl-phthalimidomalonsäurediethylester (62a*)

2.52 g (14.7 mmol) 61a* und 4.81 g (14.7 mmol) Natriumphthalimidomalonsäurediethylester [125] wurden in 15 ml DMF 3 Stunden auf 100°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde in 200 ml Wasser gegossen, das ausgefallene Produkt abgesaugt, mit Wasser gewaschen und bei 50°C i.Vak. getrocknet.

Ausbeute: 5.33 g (91%).

4-Methoxy[α-^{13}C]benzyl-phthalimidomalonsäurediethylester (62b*)

3.72 g (18.4 mmol) 61b* und 6.02 g (18.4 mmol) Natriumphthalimidomalonsäurediethylester [125] in 20 ml DMF wurden 3 Stunden auf 100°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die Reaktionsmischung in 250 ml Wasser gegossen. Das dabei ausgefallene schmierige Produkt wurde in Ether aufgenommen, die etherische Phase mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, eingedampft und der Rückstand bei 50°C i.Vak. getrocknet.

Ausbeute: 7.50 g (96%).

DL-[^{13}C]Phenylalanin (31*)

5.33 g (13.45 mmol) 62a* wurden mit 70 ml Bromwasserstoffsäure (48%) 5 Stunden gekocht. Anschließend wurde am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingedampft, der Rückstand mit 50 ml Wasser versetzt und die nichtgelöste Phthalsäure abfiltriert. Das Filtrat wurde noch 2mal ausgeethert, über Aktivkohle filtriert und mit 10%iger Ammoniaklösung auf pH 6 gestellt. Das dabei ausgefallene Produkt wurde abgesaugt, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Durch Aufarbeitung der Mutterlauge konnte noch weiteres Material

gewonnen werden.

Ausbeute: 1.65 g (74%; bezogen auf $Ba^{13}CO_3$: 50%).

Schmp.: 269°C (Zers.) [Lit. [124] nichtmarkiertes Produkt 266-267°C (Zers.)].

Reinheitsprüfung und Identifizierung durch DC (Kieselgel, Butanol/Eisessig/Wasser = 4:1:1) und Aminosäureanalyzer.

^{13}C-Gehalt: 90% (massenspektrometrisch am Methylester bestimmt).

DL-[^{13}C]Tyrosin (33*)

7.50 g (17.6 mmol) 62b* und 90 ml Bromwasserstoffsäure (48%) wurden analog 31* umgesetzt und aufgearbeitet.

Ausbeute: 2.68 g (84%; bezogen auf $Ba^{13}CO_3$: 49%).

Schmp.: 300°C (Zers.) [Lit. [124] nichtmarkiert 325°C (Zers.)].

Reinheitsprüfung und Identifizierung durch DC (Kieselgel, Butanol/Eisessig/Wasser = 4:1:1) und Aminosäureanalyzer.

^{13}C-Gehalt: 90% (massenspektrometrisch am Methylester bestimmt).

4-[α-^{13}C]Benzyl-2-trifluormethyl-3-oxazolin-5-on (63*)

498 mg (3 mmol) ^{13}C-Phenylalanin 31* und 1.1 ml (8 mmol) Trifluoressigsäureanhydrid wurden 30 Minuten auf 80°C und anschließend 30 Minuten auf 125°C (Badtemp.) erhitzt. Überschüssiges TFAA wurde i.Vak. entfernt und der Rückstand am Kugelrohr destilliert.

Ausbeute: 640 mg (87%); Kp_{KG}: 100°C/0.1 Torr.

[3-^{13}C]Phenylbrenztraubensäure (64*)

244 mg (1 mmol) 63* und 4 ml 1N HCl wurden 1 Std. am Rückfluß gekocht. Das nach dem Abkühlen ausgefallene Produkt wurde abgesaugt und getrocknet. Aus der Mutterlauge konnte noch weiteres Produkt gewonnen werden.

Ausbeute: 120 mg (72%).

4-Methoxy-[carbonyl-^{13}C]benzaldehyd (67*)

0.80 g (5.75 mmol) Anisalkohol 60b* in 50 ml abs. Dichlormethan und 9 g Mangandioxid (aktiviert; Merck, Darmstadt) wurden 2 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Über eine G4-Fritte wurde abgesaugt und das Filtrat i.Vak. vorsichtig eingedampft.

Ausbeute: 0.74 g (94%).

3-Hydroxy-4-(4-methoxyphenyl)-2H-pyran-2,5(6H)-dion (66)

Unter Inertgasatmosphäre und bei -15°C wurde während 15 Minuten eine Lösung von 4.20 g (15 mmol) Oxalsäureethyl-[3-(4-methoxyphenyl)-2-oxopropyl]ester +) (65) in 15 ml DMF, zu 4.76 g (30 mmol) DBU (96%ig) in 15 ml DMF getropft. Bei -15°C wurde noch 2 Stunden nachgerührt und dann die Reaktionsmischung langsam in 150 ml eisgekühlte 1N HCl gegossen. Das ausgefallene blaßgelbe Produkt wurde abgesaugt, mit Wasser gewaschen und i.Vak. über Phosphorpentoxid getrocknet.

Ausbeute: 2.45 g (70%); Schmp. 177-178°C (Lit. [69] 179°C).

Das Produkt ist DC-sauber (Laufmittel 1053) und nach IR- und ^{1}H-NMR-Spektrum mit dem in Lit. [69] beschriebenen identisch.

3-Hydroxy-4-(4-methoxyphenyl)-6-[(4-methoxyphenyl)-[methylen-^{13}C]-methylen]-2H-pyran-2,5(6H)-dion (68*) = ^{13}C-Grevillin A-dimethylether

1.17 g (5 mmol) Pyrandion 66 und 0.7 g (5.4 mmol) ^{13}C-Anisaldehyd 67* wurden in 25 ml Eisessig und 0.5 ml konz. Salzsäure 7 Stunden auf 50°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die Reaktionsmischung in ca. 100 ml Wasser gegossen, das ausgefallene Produkt abgesaugt, mit Wasser, Methanol und Ether gewaschen und getrocknet.

+) Der Oxalester 65 wird nach KOPANSKI [69] aus Arylessigsäurechlorid über das Diazoketon und das Bromketon hergestellt. Bei der Umsetzung des Diazoketons ist es zweckmäßig, die Bromwasserstoffsäure bei -10°C zuzutropfen und die Reaktionsmischung nicht zu refluxieren. Man vermeidet dabei die Bildung des isomeren 1-Bromketons.

Ausbeute: 1.20 g (68%); Schmp. 231-235°C (nichtmark. Produkt Lit. [69] 233-235°C).

^{13}C-NMR ([D_6]DMSO): δ= 117.04, Signal des markierten C-Atoms.

3-Hydroxy-4-(4-hydroxyphenyl)-6-[(4-hydroxyphenyl)-[methylen-^{13}C]methylen]-2H-pyran-2,5(6H)-dion (10*) = ^{13}C-Grevillin A

300 mg (8.5 mmol) 68* in 75 ml abs. Dichlormethan und 6.5 ml Bortribromid wurden unter Inertgas 30 Minuten zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen der Lösung wurde mit 75 ml konz. Salzsäure versetzt, nach 15 Minuten Rühren mit Wasser auf das doppelte Volumen verdünnt und mit Essigester ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde nacheinander mit Wasser, gesättigter Mannitlösung und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wurde mit wenig Aceton digeriert, abgesaugt und getrocknet.

Ausbeute: 246 mg (89%); Schmp. >300°C (Zers.) [Lit. [69] 350°C (Zers.)].

DC (Laufmittel 1053): Das Produkt enthält noch geringe Mengen monomethylierter Verbindung; Hauptfleck in Laufverhalten und Farbreaktion mit konz. Schwefelsäure identisch mit natürlichem Grevillin A.

^{13}C-NMR ([D_6]Aceton/[D_6]DMSO = 2:1): δ= 118.53, Signal des markierten C-Atoms.

^{13}C-Gehalt: 90% (massenspektrometrisch am M^+-Ion bestimmt).

3,6-Bis(4-methoxyphenyl)-2,5-dihydroxy-[2-^{13}C]-1,4-benzochinon (71*) = ^{13}C-Atromentin-4',4"-dimethylether

Analog dem von LOHRISCH [42] beschriebenen Verfahren wurden 1.77 g (5 mmol) ^{13}C-Grevillin-A-dimethylether 68* in 40 ml abs. Methanol mit 0.76 g (14 mmol) Natriummethylat umgelagert.

Ausbeute: 1.55 g (88%); Schmp. 294-296°C [Schmp. nichtmarkiertes Produkt Lit. [120] 297-298°C (Zers.)].

^{13}C-NMR ([D_6]DMSO): δ= 115.37, Signal des markierten C-Atoms.

^{13}C-Gehalt: 90% (massenspektrometrisch am M^+-Ion bestimmt).

3,6-Bis(4-hydroxyphenyl)-2,5-dihydroxy-[2-^{13}C]-1,4-benzochinon (2*) = ^{13}C-Atromentin

500 mg (1.42 mmol) 71* wurden 40 Stunden in 20 ml Eisessig und 5 ml HBr 48%ig gekocht. Die dunkelbraune Lösung wurde in ca. 100 ml Wasser gegossen, der ausgefallene Niederschlag durch Zentrifugation abgetrennt, mit Wasser und Aceton gewaschen und getrocknet. Das Rohprodukt war stark verunreinigt und wurde aus Dioxan umkristallisiert.

Ausbeute: 91 mg (20%) +); Schmp. >310°C.

^{13}C-NMR ([D_6]DMSO): δ= 115.26, Signal des markierten C-Atoms.

3,6-Bis(4-methoxyphenyl)-[3-^{13}C]furo[3,2-b]furan-2,5-dion (72*) = ^{13}C-Atromentinsäurelacton-4',4"-dimethylether

706.5 mg (2 mmol) 71* wurden nach WIKHOLM und MOORE [45] mit 8.5 ml DMSO und 5.7 ml Essigsäureanhydrid oxidativ umgelagert.

Ausbeute: 620 mg (88%) gelbe Kristalle; Schmp. 274.5-275°C (Schmp. nichtmarkiertes Produkt Lit. [45] 272-273°C).

α-[3-Hydroxy-4-(4-hydroxyphenyl)-5-oxo-2(5H)-[4-$^{13}C_{1/2}$]furanyliden]-[α-$^{13}C_{1/2}$]-4-hydroxyphenylessigsäure (16*) = ^{13}C-Atromentinsäure

351 mg (1 mmol) 72* in 20 ml abs. Dichlormethan wurden unter Trockeneiskühlung mit 0.4 ml (4.2 mmol) Bortribromid in 5 ml abs. Dichlormethan versetzt. Es wurde 30 Minuten unter schwachem Rückfluß erhitzt und anschließend vorsichtig mit Wasser zersetzt, wobei ein orange-rotes Produkt ausfiel. Es wurde abgesaugt, in 10 ml 1N NaOH gelöst, die Atromentinsäure mit Salzsäure ausgefällt und mit Essigester extrahiert. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat wurde eingedampft und aus dem verunreinigten Produkt durch

+) Bei einem Vorversuch mit nichtmarkiertem Material betrug die Ausbeute 65%.

Chromatographie an Polyamid AC mit Aceton/Methanol-Gemischen steigender Polarität die Atromentinsäure abgetrennt (große Verluste wegen unzureichend acetyliertem Polyamid !).

Ausbeute: 96 mg (28%); DC-saubere (Laufmittel 1053) Atromentinsäure 16*.

^{13}C-NMR ([D_6]Aceton): δ= 104.8 und 116.8, Signale der markierten C-Atome.

^{13}C-Gehalt: 90% (massenspektrometrisch am M^+-Ion des im MS gebildeten Atromentinsäurelactons bestimmt), einfach markiertes Produkt.

10.2. Acylierte Terphenylchinone 73 und 74

Allgemeine Arbeitsvorschriften

Methode A: 0.2 mmol Polyporsäure (1), Atromentin (2) oder Atromentindimethylether (71) in 50 ml abs. THF werden kurz aufgekocht und in die auf RT abgekühlte Suspension bzw. Lösung während 6 Stunden eine Lösung von 0.2 mmol Säurechlorid in 20 ml abs. THF getropft. Nach 24 Stunden Rühren bei RT wird das Lösungsmittel i.Vak. abgedampft und der Rückstand zunächst mit Petrolether und schließlich mit Aceton digeriert. Das eingedampfte acetonische Filtrat wird bei den Polyporsäure- und Atromentindimethylether-Derivaten über eine Kieselgelsäule (10 cm) mit CH_2Cl_2/Essigester = 80:20 chromatographiert. Die erste Fraktion enthält das diacylierte Produkt 74, die zweite Fraktion das monoacylierte Produkt 73.
Bei den Atromentin-Derivaten erfolgt die Trennung durch Chromatographie an Sephadex LH 20/Aceton (35 cm) oder Polyamid AC/Aceton.

Methode B: Zu 1 mmol 1 oder 71 in 100 ml abs. THF werden unter Inertgasatmosphäre 72.5 µl (1 mmol) Thalliumethylat (98%ig) gegeben. Nach 30 Minuten Rühren bei RT wird das Lösungsmittel i.Vak. entfernt, der getrocknete Rückstand in 100 ml abs. Diethylether suspendiert und mit 1.1 mmol Säurechlorid versetzt. Man rührt

48 Stunden bei RT, filtriert über Celite, wäscht mit Ether und dampft das Filtrat am Rotationsverdampfer ein. Chromatographie des Rückstandes an einer Kieselgelsäule (15 cm) liefert bei Elution mit CH_2Cl_2 das diacylierte Produkt 74 und bei anschließender Elution mit CH_2Cl_2/Essigester = 70:30 das monoacylierte Produkt 73, welches durch Tieftemperaturkristallisation aus Ether gereinigt werden kann.

Methode C: 0.5 mmol cyclisches Polyporsäurecarbonat 80 +) oder cyclisches Atromentindimethylethercarbonat 81 +) in 5 ml abs. Dichlormethan, 0.5 mmol Säurechlorid und 89 µl (0.5 mmol) N,N-Diisopropyl-ethylamin (98%ig) werden 48 h bei RT gerührt und anschließend 1 Stunde am Rückfluß gekocht. Man verdünnt mit Dichlormethan und wäscht mit verd. Salzsäure, trocknet die organische Phase über Na_2SO_4 und filtriert den Rückstand, der vorher zur Entfernung von vorhandenen Säureresten mit Petrolether digeriert wird, über eine kurze (10 cm) Kieselgelsäule mit CH_2Cl_2/-Essigester = 80:20.

+) Herstellung siehe Kapitel 10.3.

Tabelle 21. Analytische Daten der monoacylierten Terphenylchinone 73 [a]

73	...1,4-benzochinon	Schmp. [°C] (Zers.)	IR (KBr) [cm^{-1}]	Summenformel (Molmasse)	Analyse	C	H
a	2-(2Z,4E-Hexadienoyloxy)-5-hydroxy-3,6-diphenyl-	252-256	3380, br., 1740, 1663, 1600	$C_{24}H_{18}O_5$ (386.4)	Ber.	-	-
					Gef.	-	-
b	3,6-Bis(4-hydroxyphenyl)-2-(2Z,4E-hexadienoyloxy)-5-hydroxy-	~150	3430, br., 1730, 1650, br., 1610	$C_{24}H_{18}O_7$ (418.4)	Ber.	68.90	4.34
					Gef.	69.14	4.89
c	3,6-Bis(4-methoxyphenyl)-2-(2Z,4E-hexadienoyloxy)-5-hydroxy-	~100	3415, 1742, 1660, 1610	$C_{26}H_{22}O_7$ (446.5)	Ber.	69.95	4.97
					Gef.	69.93	4.87
d	2-(2E,4E-Hexadienoyloxy)-5-hydroxy-3,6-diphenyl-	164	3440, 1742, 1650, 1612	$C_{24}H_{18}O_5$ (386.4)	Ber.	74.60	4.70
					Gef.	74.86	4.75
e	3,6-Bis(4-hydroxyphenyl)-2-(2E,4E-hexadienoyloxy)-5-hydroxy-	128	3420, br., 1730, 1650, br., 1610	$C_{24}H_{18}O_7$ (418.4)	Ber.	-	-
					Gef.	-	-
f	3,6-Bis(4-methoxyphenyl)-2-(2E,4E-hexadienoyloxy)-5-hydroxy-	232-235	3425, 1740, 1650, 1610	$C_{26}H_{22}O_7$ (446.5)	Ber.	-	-
					Gef.	-	-
g	2-Acetoxy-3,6-bis(4-hydroxyphenyl)-5-hydroxy-	> 240	-	$C_{20}H_{14}O_7$ (366.3)	Ber.	65.58	3.85
					Gef.	63.78	4.05
h	2-Benzoyloxy-3,6-bis(4-hydroxyphenyl)-5-hydroxy-	242	-	$C_{25}H_{16}O_7$ (428.4)	Ber.	70.09	3.77
					Gef.	70.09	4.12
i	5-Hydroxy-3,6-diphenyl-2-phenylacetoxy-	198-200 (aus EtOH)	-	$C_{26}H_{18}O_5$ (410.4)	Ber.	76.09	4.42
					Gef.	75.85	4.46
j	5-Hydroxy-2-(4-methoxyphenylacetoxy)-3,6-diphenyl-	199-200 (aus EtOH)	3405, 1762, 1660, 1620	$C_{27}H_{20}O_6$ (440.5)	Ber.	73.63	4.58
					Gef.	69.90	4.52

a) ^{1}H-NMR-Daten siehe Kapitel 6.2.

Tabelle 22. Analytische Daten der diacylierten Terphenylchinone 74 [a)]

74	...1,4-benzochinon	Schmp. [°C] (Zers.)	IR (KBr) [cm^{-1}]
a	2,5-Bis(2Z,4E-hexadienoyloxy)-3,6-diphenyl-	210-212	1742, 1678, 1640, 1595
b	2,5-Bis(2Z,4E-hexadienoyloxy)-3,6-bis(4-hydroxyphenyl)-	~220	3430, br., 1740,1670,1640,1610
c	2,5-Bis(2Z,4E-hexadienoyloxy)-3,6-bis(4-methoxyphenyl)-	249	1742, 1678, 1640, 1610
d	2,5-Bis(2E,4E-hexadienoyloxy)-3,6-diphenyl-	-	1740, 1678, 1648, 1610
e	2,5-Bis(2E,4E-hexadienoyloxy)-3,6-bis(4-hydroxyphenyl)-	158	3505, 1740, 1660,1643,1610
f	2,5-Bis(2E,4E-hexadienoyloxy)-3,6-bis(4-methoxyphenyl)-	244-246	1743, 1668, 1645, 1605
g	2,5-Diacetoxy-3,6-bis(4-hydroxyphenyl)-	244-245	-
h	2,5-Bis(benzoyloxy)-3,6-bis(4-hydroxyphenyl)-	280-295 (Lit. [11] 285-295)	-
i	2,5-Bis(phenylacetoxy)-3,6-diphenyl-	208	-

a) ^{1}H-NMR-Daten siehe Kapitel 6.2.

10.3. Cyclische Carbonate von Terphenylchinonen

4,7-Diphenyl-1,3-benzodioxol-2,5,6-trion (80) = cyclisches Polyporsäurecarbonat

585 mg (2 mmol) Polyporsäure 1 wurden in 50 ml abs. CH_2Cl_2 suspendiert und mit 324 µl (4 mmol) abs. Pyridin und 8.4 ml (16 mmol) Phosgenlösung (20%ig in Toluol) versetzt. Über Nacht wurde bei RT gerührt, anschließend abgesaugt, der Rückstand mit CH_2Cl_2 gewaschen und i.Vak. bei 50°C getrocknet.

Ausbeute: 530 mg (83%) ziegelrote Kristalle aus Toluol; Schmp. 255°C (Zers.).

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ= 7.38-7.75 (m).

IR (KBr): 1908 (sh), 1890 (sh), 1870 (sst), 1700, 1685, 1655, 1615, 1600, 1493 cm^{-1}.

MS (DE 190°C): m/e= 320 (M^++2), 318 (M^+), 292,290.

$C_{19}H_{10}O_5$	Ber.	C 71.70	H 3.17
(318.3)	Gef.	C 71.62	H 3.21

4,7-Bis(4-methoxyphenyl)-1,3-benzodioxol-2,5,6-trion (81) = cyclisches Atromentindimethylethercarbonat

705 mg (2 mmol) Atromentin-4',4"-dimethylether 71 wurden in 100 ml CH_2Cl_2 suspendiert und analog 80 umgesetzt. Ausnahme: Es wurde 3 Tage bei RT gerührt.

Ausbeute: 672 mg (89%) tiefviolette Kristalle aus Toluol; Schmp. 243°C (Zers.).

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ= 3.86 (s, 6H), 6.99, 7.62 (AA'BB'-System, J= 8.6 Hz; 8H).

IR (KBr): 2860 (w), 1912 (sh), 1892 (sh), 1868 (sst), 1815 (sh), 1698, 1683, 1642, 1610, 1572, 1515, 1505 cm^{-1}.

MS (DE 220°C): m/e= 380.0901 (75%, ber. für $C_{21}H_{16}O_7$ 380.0896, (M+2), 352 (25), 350 (4), 91 (100).

$C_{21}H_{14}O_7$	Ber.	C 66.67	H 3.73
(378.3)	Gef.	C 66.40	H 3.81

10.4. Grevillinderivate

3-(2Z,4E-Hexadienoyloxy)-4-(4-methoxyphenyl)-6-[(4-methoxyphenyl)methylen]-2H-pyran-2,5(6H)-dion (75a)

70.5 mg (0.2 mmol) Grevillin-A-dimethylether 68 in 50 ml abs. THF und 6 mg (0.2 mmol) Natriumhydrid (80%ig) wurden 30 Minuten bei RT gerührt und anschließend mit 26 mg (0.2 mmol) 2Z,4E-Sorbinsäurechorid [102-104] versetzt. Nach 2 Stunden wurde i.Vak. eingedampft und der Rückstand über eine Kieselgel-Säule (CH_2Cl_2/Essigester = 80:20) chromatographiert.

Ausbeute: 52 mg (58%) orangegelbe Kristalle; Schmp. 188-190°C.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ= 1.88 (dm, J= 6.9 Hz; 3H), 3.82 (s; 3H), 3.86 (s; 3H), 5.67 (dm, J= 11.1 Hz; 1H), 6.20 (dq, J= 14.6 + 6.9 Hz; 1H), 6.72 (dd, J= 11.4 + 11.1 Hz; 1H), 6.93, 7.36 (AA'BB'-System, J= 9 Hz; 4H), 6.96, 7.91 (AA'BB'-System, J= 9 Hz; 4H; Benzyliden-Ring), 7.11 (s; 1H), ~7.3 (m, verdeckt; 1H).

$C_{26}H_{22}O_7$	Ber. C 69.95	H 4.97
(446.5)	Gef. C 69.81	H 4.98

4-(4-Methoxyphenyl)-6-[(4-methoxyphenyl)methylen]-3-phenylacetoxy-2H-pyran-2,5(6H)-dion (75b)

Analog der bei 75a angegebenen Vorschrift wurden 0.2 mmol 68 mit 31 mg (0.2 mmol) Phenylessigsäurechlorid acyliert.

Ausbeute: 73 mg (78%) orangegelbe Nadeln (aus Cyclohexan/Aceton); Schmp. 210°C.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ= 3.83 (s; 2H), 3.83 (s; 3H), 3.87 (s; 3H), 6.82, 7.21 (AA'BB'-System, J= 9 Hz; 4H), 6.96, 7.91 (AA'BB'-System, J= 9 Hz; 4H; Benzyliden-Ring), 7.11 (s; 1H), 7.27 ("s"; 5H).

$C_{28}H_{22}O_7$	Ber. C 71.48	H 4.71
(470.5)	Gef. C 71.64	H 4.75

Grevillin-A-trimethylether 76
3-Methoxy-4-(4-methoxyphenyl)-6-[(4-methoxyphenyl)methylen]-2H-pyran-2,5(6H)-dion

70.5 mg (0.2 mmol) Grevillin-A-dimethylether 68, 138.2 mg (1 mmol) Kaliumcarbonat trocken und 126.1 mg (1 mmol) Dimethylsulfat in 50 ml abs. Aceton wurden 3 Tage bei RT gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung eingedampft und der Rückstand über Kieselgel mit CH_2Cl_2 chromatographiert.

Ausbeute: 55 mg (75%) gelbe Kristalle aus Essigester; Schmp. 171°C.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ= 3.85 (s; 3H), 3.86 (s; 3H), 3.94 (s; 3H), 6.97, 7.37 (AA'BB'-System, J= 9 Hz; 4H), 6.97, 7.90 (AA'BB'-System, J= 9 Hz; 4H, Benzylidenring), 7.03 (s; 1H).

IR (KBr): 3000 (w), 2280 (w), 1735 (sst), 1661 (m), 1615 (st), 1590 (sst), 1570 (st), 1518 (st) cm^{-1}.

$C_{21}H_{18}O_6$	Ber. C 68.85	H 4.95
(366.4)	Gef. C 69.00	H 4.98

10.5. Carbonate 82 und Urethane 83 von Terphenylchinonen

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Herstellung der Carbonate 82

0.2 mmol cyclisches Carbonat 80 oder 81 in 10 ml abs. CH_2Cl_2 und 0.5 ml abs. Ethanol werden 1 Stunde bei RT gerührt (bei 80 Farbänderung von rot ⟶ orange, bei 81 von violett ⟶ rotbraun). Lösungsmittel und überschüssiges Ethanol werden abgedampft und der Rückstand aus Ether (Tieftemperatur) oder Benzol umkristallisiert. Analytische Daten siehe Tabelle 23.

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Herstellung der Urethane 83

0.2 mmol cyclisches Carbonat 80 oder 81 in 5 ml CH_2Cl_2 und 0.4 mmol Diethylamin oder Dimethylaminlösung (40%ig) werden 15 Minu-

Tabelle 23. Analytische Daten der Carbonate und Urethane [a]

Nr.	...1,4-benzochinon [b]	Schmp. [°C] (Zers.) (Lösungsmittel)	IR (KBr) [cm^{-1}]	Summenformel (Molmasse)		Analyse C	H	N
82a	3,6-Bis(4-methoxyphenyl)-5-hydroxy-2-(methoxycarbonyloxy)-	171 (Ether) [c]	3440, 1783, 1660, 1612	$C_{22}H_{18}O_8$ (410.4)	Ber.	-	-	-
					Gef.	-	-	-
82b	2-(Ethoxycarbonyloxy)-5-hydroxy-3,6-diphenyl-	165 (Toluol/Cyclohexan)	3400, 1781, 1662, 1600	$C_{21}H_{16}O_6$ (364.4)	Ber.	69.23	4.43	-
					Gef.	68.91	4.42	-
82c	3,6-Bis(4-methoxyphenyl)-2-(ethoxycarbonyloxy)-5-hydroxy-	170 (Ether) [c]	3420, 1772, 1655, 1611	$C_{23}H_{20}O_8$ (424.4)	Ber.	65.09	4.75	-
					Gef.	65.32	4.70	-
83a	2-(Dimethylxarbamoyloxy)-5-hydroxy-3,6-diphenyl-	156 (Ether) [c]	3200,br.,1730, 1662,1621	$C_{21}H_{17}NO_5$ (363.4)	Ber.	69.42	4.72	3.86
					Gef.	69.68	4.87	3.94
83b	3,6-Bis(4-methoxyphenyl)-2-(dimethylcarbamoyloxy)-5-hydroxy-	152 (Et_2O/EtOAc)	3340,br.,1730, 1662,1611	$C_{23}H_{21}NO_7$ (423.4)	Ber.	65.24	5.00	3.31
					Gef.	65.36	5.02	3.41
83c	2-(Diethylcarbamoyloxy)-5-hydroxy-3,6-diphenyl-	150-152 (Et_2O) [c]	3270,br.,1732, 1670,1642,1632	$C_{23}H_{21}NO_5$ (391.4)	Ber.	70.58	5.41	3.58
					Gef.	70.90	5.45	3.54
83d	3,6-Bis(4-methoxyphenyl)-2-(diethylcarbamoyloxy)-5-hydroxy-	155 (Ether) [c]	3340,1718, 1668,1615	$C_{25}H_{25}NO_7$ (451.5)	Ber.	66.51	5.58	3.10
					Gef.	66.28	5.45	2.98

a) ^{1}H-NMR-Daten siehe Tabelle 14, Kapitel 6.2.

b) Die 4-Methoxyphenyl-Verbindungen sind im kristallinen Zustand braunviolett, die Phenyl-Verbindungen rot gefärbt.

c) Tieftemperaturkristallisation.

ten bei RT gerührt. Mit CH_2Cl_2 wird verdünnt, mit 2N HCl gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Reinigung durch Filtration über kurze (10 cm) Kieselgelsäule (CH_2Cl_2/Essigester/CH_3OH = 70:20:10) und Umkristallisation aus Et_2O (Tieftemperatur). Analytische Daten siehe Tabelle 23.

10.6. Versuche zur Synthese von Violett-1

Epoxidierte Sorbinoyl-Terphenylchinone 43 und 84

0.3 mmol Sorbinoyl-Terphenylchinon 73a-f in 4 ml abs. Dichlormethan und 148 mg (0.6 mmol) m-Chlorperbenzoesäure (70%ig) werden 3 Tage bei RT gerührt. Man filtriert ausgefallene m-Chlorbenzoesäure ab und reinigt durch Säulenchromatographie an Sephadex LH 20/Dichlormethan oder Sephadex LH 20/Aceton. Mit Ausnahme von 84c wurden die noch schwach verunreinigten Produkte direkt weiterverarbeitet. ^{1}H-NMR-Daten siehe Tabelle 12, Kapitel 6.2.

84c: Ausbeute 101 mg (73%); Schmp. 174-175°C, karminrote Kristalle aus Ether (Tieftemperaturkristallisation).

IR (KBr): 3340 (br), 3000 (w), 2860 (w), 1750 (m), 1662 (st), 1610 (st), 1514, 1370, 1294, 1250, 1193, 1121, 1109, 1038, 1017, 955, 902, 850, 836 cm^{-1}.

$C_{26}H_{22}O_8$	Ber. C 67.53	H 4.80
(462.5)	Gef. C 67.01	H 4.79

Behandlung von 43 mit Trifluoressigsäure

Ca. 10 mg Rohmaterial des Epoxids 43 in 5 ml Chloroform wurden mit 10 Tropfen Trifluoressigsäure versetzt. 8 Minuten nach der Zugabe wurde die Reaktion durch Zugabe von festem Natriumhydrogencarbonat gestoppt. Mit Essigester wurde extrahiert und das erhaltene Rohprodukt durch Dünnschichtchromatographie (Kieselgel/Laufmittel 1053) in zwei violette Substanzen (R_F= 0.32 und 0.28) aufgetrennt.

85b ca. 2 mg; R_F= 0.32

^{1}H-NMR ([D_6]Aceton): δ= 1.4 (dm, J= 5.6 Hz), 4.11 (m), 6.09 (dm, J= 9.9 Hz), 6.52 (d, J= 9.9 Hz), 6.90, 7.49 (AA'BB'-System, J= 8.9 Hz), 6.90, 7.52 (AA'BB'-System, J= 8.9 Hz).

Von der Substanz mit R_F= 0.28 (ca. 1 mg) konnte kein aussagekräftiges ^{1}H-NMR-Spektrum erhalten werden.

Behandlung von 84a mit Trifluoressigsäure

10 mg 84a in 5 ml Chloroform wurden bei RT mit 5 Tropfen Trifluoressigsäure versetzt. Nach 15 Minuten wurde mit $NaHCO_3$-Lösung ausgeschüttelt, die org. Phase über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Durch Dünnschichtchromatographie (Kieselgel; Laufmittel Chloroform/Essigester) = 80:20) konnte das Rohprodukt in zwei rotgefärbte Substanzen 85a und 86a, die im Verhältnis von etwa 2:1 vorliegen, aufgetrennt werden.

85a: R_F= 0.41; Schmp. 241-243°C rotgefärbtes mikrokristallines Produkt.

UV (Ethanol): λ_{max}= 264 nm (lgε = 4.46), 320 (sh, 3.59), 466 (3.59).

IR (KBr): 3475 (st), 2950 (w), 1674 (m), 1645 (br., st), 1494, 1360, 1242, 1200, 1361, 1338, 1300, 1011, 942, 918, 820, 778, 762, 690 cm^{-1}.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): siehe Tabelle 15.

86a: R_F= 0.38; Schmp. 193-195°C (Zers.) rotgefärbtes mikrokristallines Produkt.

UV (Ethanol, qualitativ): λ_{max}= 264 nm, 320, 465.

IR (KBr): 3460 (br), 3000 (w), 1674 (sh), 1646 (st), 1632 (sh), 1362, 1332, 1300, 1180, 1150, 1090, 1030, 940, 820, 770, 748, 684 cm^{-1}.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): siehe Tabelle 15.

Behandlung von 84c mit Trifluoressigsäure

92.5 mg (0.2 mmol) 84c in 3 ml Dichlormethan abs. wurden bei RT mit 74 µl (1 mmol) Trifluoressigsäure versetzt. Nach 10 Minuten wurde mit ges. $NaHCO_3$-Lösung gewaschen, die org. Phase über Natriumsulfat getrocknet, eingedampft und der Rückstand durch Säulenchromatographie an Sephadex LH 20/Dichlormethan (30 cm, Ø 2.5 cm) aufgetrennt.

Fraktion 1: 3 mg

87c: R_F= 0.55; Schmp. 245°C; violette Kriställchen.

IR (KBr): 2960 (w), 2860 (w), 1925 (sh), 1680 (m), 1640 (br., m), 1610 (st), 1514, 1465, 1350, 1305, 1291, 1252, 1198, 1150, 1100, 1042, 952, 835, 815, 789, 772 cm^{-1}.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$ und [D_6])Aceton): siehe Tabelle 15:

MS (DE 180°C): m/e= 446 (38%, M^++2), 444 (12, M^+), 418 (12), 416 (8), 352 (4), 350 (13), 159 (100), 135 (38), 95 (57).

87c zeigt im DC das gleiche Laufverhalten wir das aus 44 und Diazomethan gebildete methylierte Produkt.

Fraktion 2: 15 mg

86c: R_F= 0.33; Schmp. 228-231°C; violette Kriställchen aus Aceton (Tieftemperatur).

IR (KBr): 3500 (br., m), 3000 (br., w), 2860 (w), 1672 (m), 1635 (sh), 1611 (st), 1515, 1358, 1345, 1300, 1258, 1200, 1180, 1152, 1140, 1088, 1038, 974, 936, 820, 765 cm^{-1}.

^{1}H-NMR ([D_6]Aceton): siehe Tabelle 15.

MS (DE 180°C): m/e= 464 1425 (7%, ber. für $C_{26}H_{24}O_8$ 464.1471, M^++2), 462.1306 (24, $C_{26}H_{22}O_8$, 462.1314, M^+), 446 (11), 444 (7), 420 (44), 419 (13), 418 (18), 416 (5), 391 (18), 390 (19), 352 (11), 324 (19), 294 (44), 159 (100).

Fraktion 3: 53 mg

85c: R_F= 0.37; Schmp. 240-243°C; violette Kriställchen.

IR (KBr): 3500 (br., m), 3000 (br., w), 2860 (w), 1675 (m), 1630 (sh), 1610 (st), 1515, 1352, 1308, 1290, 1255, 1195, 1160, 1140, 1090, 1037, 1060, 945, 920, 834, 818, 785, 770 cm^{-1}.

^{1}H-NMR ([D_6]Aceton): siehe Tabelle 15.

MS (DE 200°C): m/e= 464 (12%, M^++2), 462 (13, M^+), 434 (3), 420 (10), 418 (3), 391 (8), 390 (9), 354 (7), 352 (6), 324 (22), 294 (27), 159 (100).

ANHANG

Massenspektrometrische Bestimmung des ^{13}C-Gehaltes in markierten Verbindungen mit Hilfe von Vergleichsspektren

Grundlage des Rechenverfahrens ist die Subtraktionsmethode von BIEMANN [126,127]. Für ^{13}C-Gehaltsbestimmungen ist hierbei allerdings zu berücksichtigen, daß sich die relative Häufigkeit des natürlichen ^{13}C-Isotopensignals mit jeder Einbaustufe um 1.1 vermindert und nicht mit einem konstanten Wert korrigiert werden darf [59a].

Nach der BIEMANN-Methode ergibt sich z.B. für ein $^{13}CO_2$ mit einem Gehalt von 20 Atom-%-^{13}C ein Wert von 19.28 "Atom-%-Überschuß". Dieser "Atom-%-Überschuß" ist nicht identisch mit dem Atom-%-Überschuß, den man erhält, wenn man vom tatsächlichen ^{13}C-Gehalt den natürlichen Anteil in Höhe von 1.1 Atom-% subtrahiert.

Das in der vorliegenden Arbeit bei den Gehaltsbestimmungen angewandte modifizierte Verfahren erlaubt mit einer genügenden Genauigkeit direkt die Ermittlung des ^{13}C-Gehaltes in Atom-%. Dies soll an zwei Beispielen erläutert werden.

Zunächst müssen aus dem normierten Vergleichsspektrum (I'_M=100; I'_{M+1}; I'_{M+2}) Korrekturfaktoren bestimmt werden. Es bedeuten:

x= Anzahl der C-Atome im Ion, an dem die Bestimmung vorgenommen wird

y= Anzahl der markierten C-Atome [+)]

z= Anzahl der nichtmarkierten C-Atome (z= x-y)

[+)] Ist bekannt oder kann z.B. nach der BIEMANN-Methode unter Berücksichtigung der ^{13}C-Abreicherung pro Einbaustufe bestimmt werden.

$a = (I'_{M+1} - 1.12 \cdot x)/100$ [Anteil von (M+H)-Ionen in I_{M+1}, bezogen auf I_M]

$b = a \cdot 1.12 \cdot x$ [Anteil von (M+H)-Ionen in I_{M+2}, bezogen auf I_{M+1}]

$c = [I'_{M+2} - b - \frac{1.25}{200} \cdot x \cdot (x-1)]/100$ [Anteil von (M+2H)-Ionen in I_{M+2}, bezogen auf I_M]

$f_1 = (1.12 \cdot z)/100$ $\quad f_2 = [\frac{1.25}{200} \cdot z \cdot (z-1)]/100$

Beispiel 1)

Es soll der ^{13}C-Gehalt des markierten C-Atoms in [carboxy-^{13}C]-Benzoesäure bestimmt werden. Im M^+-Bereich werden folgende Intensitäten gemessen: m/e= 122 (10.00), 123 (91.17), 124 (10.60), 125 (0.47). Das MS des nichtmarkierten Derivats liefert die normierten Intensitäten: m/e= 122 (100 = I'_M), 123 (12.84 = I'_{M+1}), 124 (0.65 = I'_{M+2}).

Mit x=7 und z=6 erhält man:

a= 5.0 b= 0.392 c= 0 f_1= 6.72/100 f_2= 0.1875/100

Für die Korrektur der (M+H)- und (M+2H)-Anteile werden die Werte $I_M \cdot a$ und $I_M \cdot c$ vom (I_{M+1})- bzw. (I_{M+2})-Peak subtrahiert. Mit dem sich ergebenden Wert bei m/e= 123 werden die von m/e= 124 bzw. 125 zu subtrahierenden Werte berechnet usw.

Masse m/e	122	123	124	125
Gemessene Intensitäten (beliebige Einheiten)	10.00	91.17	10.60	0.47
1. Subtraktion (Faktoren a und c)		-0.5	-0	
		90.67	10.60	0.47
2. Subtraktion (Faktoren a und c)			-4.53	-0
			6.07	0.47
3. Subtraktion (Faktoren a und c)				-0.30
Intensitäten nach der (M+H)- und (M+2H)-Korrektur	10.00	90.67	6.07	0.17

Die folgende Subtraktion (Korrektur bezüglich des natürlichen ^{13}C-Anteils) mit den Faktoren f_1 und f_2 liefert die korrigierten Intensitäten, aus denen die Mol-% der markierten Moleküle bestimmt werden können:

	10.00	90.67	6.07	0.17
4. Subtraktion (Faktoren f_1 und f_2)		-0.67	-0.02	
		90.00	6.05	0.17
5. Subtraktion (Faktoren f_1 und f_2)			-6.05	-0.17
Korrigierte Intensitäten	10.00	90.00	-	-
Mol-%	10.0	90.0		

mittlerer ^{13}C-Gehalt/markiertem C-Atom

$$\frac{0 \cdot 10 + 1 \cdot 90}{1} = 90 \text{ Atom-\%}$$

D.h. 90% der Moleküle haben die Zusammensetzung $C_6^{1.1}C_1^{100}H_6O_2$ und 10% $C_6^{1.1}C_1^{0}H_6O_2$ bzw. der Gehalt des markierten C-Atoms ist 90 Atom-%.

Bei mono-markierten Molekülen, wie im vorliegenden Beispiel, kann die Bestimmung auch vereinfacht durchgeführt werden. Dazu wird der Faktor

$$f_1' = (a + 1.12 \cdot z)/100$$

benötigt. Mit diesem Faktor (= 11.72) wird die Intensität I_M multipliziert und der erhaltene Wert von I_{M+1} subtrahiert. Man erhält dann direkt die korrigierten Intensitäten.

Beispiel 2)

Variegatsäure aus einer ^{13}C-Tyrosin-geimpften Mycelkultur liefert im MS folgende ($M-H_2O$)-Peaks: m/e= 354 (52.5), 355 (13.7), 356 (3.3). Im normierten Vergleichsspektrum erhält man: m/e= 354 (100, I_M'), 355 (21.1, I_{M+1}'), 356 (4.1, I_{M+2}'). Durch eine Überschlagsrechnung mit der BIEMANN-Methode wurde gefunden, daß 2 C-Atome im Molekül markiert sind.

Mit x=18, y=2 und z=16 ergeben sich folgende Faktoren:

a= 0.94/100 b= 0.19 c=1.99/100 f_1=17.92/100 f_2=1.5/100

Die Korrektur bezüglich des (M+H)- und (M+2H)-Anteils (1. und 2. Subtraktion) und des natürlichen ^{13}C-Gehaltes (3. und 4. Subtraktion) ergibt die korrigierten Intensitäten, aus denen die Mol-% der verschieden markierten Moleküle berechnet werden können:

Masse m/e	354	355	356
Gemessene Intensitäten	52.5	13.7	3.3
1. Subtraktion (Faktoren a und c)		-0.5	-1.0
		13.2	2.3
2. Subtraktion (Faktor a)			-0.1
	52.5	13.2	2.2
3. Subtraktion (Faktoren f_1 und f_2)		-9.4	-0.8
		3.8	1.4
4. Subtraktion (Faktor f_1)			-0.7
Korrigierte Intensitäten	52.5	3.8	0.7
Mol-%	92.1	6.7	1.2
Atome-^{13}C/Molekül	0	1	2

mittlerer ^{13}C-Gehalt der markierten Atome

$$\frac{0 \cdot 92.1 + 1 \cdot 6.7 + 2 \cdot 1.2}{2}$$

= 4.55 Atom-%/markiertes C-Atom

LITERATURVERZEICHNIS

1) W.B.TURNER, 'Fungal Metabolites', Academic Press, London - New York 1971.

2) A.I.LASKIN und H.A.LECHEVALIER, 'CRC Handbook of microbiology', Vol.3 Microbial Products, CRC Press, Cleveland, Ohio 1973.

3) C.H.EUGSTER, Z.Pilzkd. 39, 45 (1973).

4) W.STEGLICH, Chemie in unserer Zeit 9, 117 (1975); W.STEGLICH, in 'Pigments in Plants' (F.-C.CZYGAN, Ed.), 2nd Edit., Gustav Fischer, Stuttgart 1980.

5) a) A.BRESINSKY und P.ORENDI, Z.Pilzkd. 36, 135 (1970);
b) A.BRESINSKY und A.RENNSCHMID, Ber.Dtsch.Bot.Ges. 84, 313 (1971);
c) A.BRESINSKY, Bull.Soc.Linn.Lyon, n° spécial, février 1974, 61;
d) H.BESL, A.BRESINSKY und I.KRONAWITTER, Z.Pilzkd. 41, 81 (1975);
e) H.BESL und A.BRESINSKY, Z.Pilzkd. 43, 311 (1977);
f) A.BRESINSKY und H.BESL, Z.Mykol. 45, 247 (1979).

6) R.H.THOMSON, 'Naturally occuring Quinones', Academic Press, London - New York 1971.

7) a) C.STAHLSCHMIDT, Liebigs Ann.Chem. 187, 177 (1877); 195, 365 (1879);
b) F.KÖGL, Liebigs Ann.Chem. 447, 78 (1926).

8) a) W.THÖRNER, Ber.Dtsch.Chem.Ges. 11, 533 (1878); 12, 1630 (1879);
b) F.KÖGL und J.J.POSTOWSKY, Liebigs Ann.Chem. 440, 19 (1924); 445, 159 (1926).;
c) F.KÖGL und H.BECKER, Liebigs Ann.Chem. 465, 211 (1928).

9) a) M.AKAGI, J.Pharm.Soc.Jpn. 62, 191 (1942); 62, 202 (1942);
b) E.JÄGERS, H.-J.LOHRISCH und W.STEGLICH, unveröffentlicht.

10) J.GRIPENBERG, Acta Chem.Scand. 14, 135 (1960).

11) J.GRIPENBERG, Acta Chem.Scand. 10, 1111 (1956).

12) J.GRIPENBERG, Tetrahedron Lett. 1974, 619.

13) T.C.McMORRIS und M.ANCHEL, Tetrahedron Lett. 1963, 335; Tetrahedron 23, 3985 (1967).

14) P.V.DIVEKAR, G.READ, L.C.VINING und R.H.HASKINS, Can.J. Chem. 37, 1970 (1959).

15) W.A.JERRAM, A.G.McINNES, W.S.G.MAASS, D.G.SMITH, A.TAYLOR und J.A.WALTER, Can.J.Chem. 53, 727 (1975).

16) J.GRIPENBERG, Acta Chem.Scand. 12, 1411 (1958).

17) K.WEISGRABER, U.WEISS, G.W.A.MILNE und J.V.SILVERTON, Phytochemistry 11, 2585 (1972).

18) G.READ und L.C.VINING, Chem.Ind. (London) 1959, 1547.

19) A.K.BOSE, K.S.KHANCHANDANI, P.T.FUNKE und M.ANCHEL, Chem. Commun. 1969, 1347.

20) M.ANCHEL, A.K.BOSE, K.S.KHANCHANDANI und P.T.FUNKE, Phytochemistry 9, 2335 (1970).

21) G.READ, L.C.VINING und R.H.HASKINS, Can.J.Chem. 40, 2357 (1962).

22) H. BESL, Dissertation, TU München 1971.

23) a) H.BESL, A.PROX und W.STEGLICH, Tetrahdron Lett.1972, 4895;
b) H.BESL, I.MICHLER, R.PREUSS und W.STEGLICH, Z.Naturforsch. 29c, 784 (1974).

24) G.PATTENDEN, Fortschritte d.Chem.org.Naturst. 35, 133 (1978).

25) K.ZIPFEL, Dissertation, TU Berlin 1974.

26) a) J.MURRAY, J.Chem.Soc. 1952, 1345;
b) J.SAMTESSON, Phytochemistry 6, 685 (1967).

27) W.STEGLICH, W.FURTNER und A.PROX, Z.Naturforsch. 23b, 1044 (1968).

28) P.C.BEAUMONT, R.L.EDWARDS und G.C.ELSWORTHY, J.Chem.Soc.C 1968, 2968.

29) W.STEGLICH, W.FURTNER und A.PROX, Z.Naturforsch. 24b, 941 (1969).

30) W.STEGLICH, W.FURTNER und A.PROX, Z.Naturforsch. 25b, 557 (1970).

31) J.GRIPENBERG und J.MARTIKKALA, Acta Chem.Scand. 23, 2583 (1969).

32) a) F.VON MASSOW, Phytochemistry 16, 1695 (1977);
b) F.VON MASSOW und H.E.NOPPEL, Phytochemistry 16, 1699 (1977).

33) a) K.MOSBACH, Biochem.Biophys.Res.Commun. 17, 363 (1964);
b) K.MOSBACH, Acta Chem.Scand. 21, 2331 (1967).

34) a) W.S.G.MAASS, G.H.N.TOWERS und A.C.NEISH, Ber.Dtsch.Bot. Ges. 77, 157 (1964);
b) W.S.G.MAASS und A.C.NEISH, Can.J.Bot. 45, 59 (1967);
c) W.S.G.MAASS, Phytochemistry 9, 2477 (1970).
35) P.KARLSON, 'Kurzes Lehrbuch der Biochemie', 8.Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1972.
36) R.L.EDWARDS und M.GILL, J.Chem.Soc., Perkin Trans. 1 1973, 1921.
37) N.OJIMA, S.TAKENAKA und S.SETO, Phytochemistry, a) 12, 2527 (1973); b) 14, 573 (1975).
38) H.BESL, A.BRESINSKY, W.STEGLICH und K.ZIPFEL, Chem.Ber. 106, 3223 (1973).
39) W.STEGLICH, A.THILMANN, H.BESL und A.BRESINSKY, Z.Naturforsch. 32c, 46 (1977).
40) a) R.L.EDWARDS, G.C.ELSWORTHY und N.KALE, J.Chem.Soc. C 1967, 405;
b) R.L.EDWARDS und M.GILL, J.Chem.Soc., Perkin Trans. 1 1973, 1529.
41) a) E.HASLAM, 'The Sikimate Patnway', Butterworth, London 1974;
b) J.B.HARBORNE, in 'Biosynthesis', Specialist Periodical Reports, The Chemical Society, London, 5, 34 (1974) und dort zitierte Literatur.
42) H.-J.LOHRISCH, Dissertation, Univ. Bonn 1977.
43) H.BECKER, A.DETZEL, F.KÖGL und G.de VOSS, Liebigs Ann.Chem. 465, 211 (1928).
44) R.L.FRANK, G.R.CLARK und J.N.COKER, J.Am.Chem.Soc. 72, 1824 (1950).
45) R.J.WIKHOLM und H.W.MOORE, J.Am.Chem.Soc. 94, 6152 (1972).
46) F.KÖGL, H.BECKER, G.de VOSS und E.WIRTH, Liebigs Ann.Chem. 465, 243 (1928).
47) Lit. [1], Seite 14.
48) a) M.C.GAYLORD, R.G.BENEDICT, G.M.HATFIELD und L.R.BRADY, J.Pharm.Sci. 59, 1420 (1970);
b) M.C.GAYLORD und L.R.BRADY, J.Pharm.Sci.60, 1503 (1971).
49) W.STEGLICH, Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 353, 124 (1972).
50) W.STEGLICH, R.ARNOLD, R.LÖSEL und W.REININGER, Chem.Commun. 1972, 102.

51) K.NITTA, R.J.STADELMANN und C.H.EUGSTER, Helv.Chim.Acta 60, 1747 (1977) und dort zitierte Literatur.
52) Siehe H.MUSSO, Tetrahedron 35, 2843 (1979).
53) a) A.L.BATTERSBY, P.W.SHELDRAKE und J.A.MILNER, Tetrahedron Lett. 1974, 3315;
b) C.R.HUTCHINSON, A.H.HECKENDORF, P.E.DADDONA, E.HAGAMANN und E.WENKERT, J.Am.Chem.Soc. 96, 5609 (1974).
54) M.TANABE, in 'Biosynthesis', Specialist Periodical Reports, The Chemical Society, London, a) 2, 241 (1973); b) 3, 247 (1975); c) 4, 204 (1976).
55) T.J.SIMPSON, Chem.Soc.Rev. 4, 497 (1975).
56) A.G.McINNES, J.A.WALTER, J.L.C.WRIGHT und L.C.VINING, in 'Topics in Carbon-13 NMR Spectroscopy' (G.C.LEVY, Hrsg.), Bd. 2, S. 213, Wiley-Interscience, New York 1976.
57) S.A.BROWN, in 'Biosynthesis', Specialist Periodical Reports, The Chemical Society, London, 1, 1 (1972) und dort zitierte Literatur.
58) E.BREITMAIER und W.VOELTER, ^{13}C NMR Spectroscopy, Verlag Chemie, Weinheim 1974.
59) a) J.SEIBL, Massenspektrometrie, Akademische Velagsgesellschaft, Frankfurt/M 1970;
b) G.R.WALLER, Hrsg., Biochemical Applications of Mass Spetrometry, Wiley-Interscience, New York 1972.
60) K.MOSBACH, H.GUILFORD und M.LINDBERG, Tetrahedron Lett. 1974, 1645.
61) M.LOUNASMAA und A.KARJALAINEN, Acta Chem.Scand. 27, 3427 (1973).
62) a) F.ESSER und W.STEGLICH, Phytochemistry 12, 1817 (1973);
b) R.PREUSS und W.STEGLICH, Phytochemistry 14, 1119 (1975).
63) A.BRESINSKY, Z.Naturforsch. 28c, 627 (1973).
64) H.BESL, A.BRESINSKY, L.KOPANSKI und W.STEGLICH, Z.Naturforsch. 33c, 820 (1978).
65) A.BRESINSKY und R.BACHMANN, Z.Naturforsch. 26b, 1086 (1971).
66) R.L.EDWARDS, J.Chem.Res. 1977, 276.
67) Lit. [41a], Seite 21, 38 und 129 und dort zitierte Literatur.
68) H.BESL und A.BRESINSKY, Botanisches Institut, Univ. Regensburg.
69) L.KOPANSKI, Diplomarbeit, Univ. Bonn 1976.

70) G.SPITELLER, 'Massenspektrometrische Strukturanalyse organischer Verbindungen', Verlag Chemie, Weinheim 1966, S.270.
71) R.D.GRIGSBY, W.D.JAMIESON, A.G.McINNES, W.S.G.MAASS und A.TAYLOR, Can.J.Chem. 52, 4117 (1974).
72) J.A.ELVIDGE und P.D.RALPH, J.Chem.Soc. B 1966, 243.
73) A.BRESINSKY und H.BESL, Beihefte zur Sydowia VIII, Annales Mycologici Ser. II. 1979, 98.
74) K.H.HOLLENBEAK und M.E.KUEHNE, Tetrahedron 30, 2307 (1974).
75) C.A.REILLY und J.D.SWALEN, J.Chem.Phys. 35, 1522 (1961).
76) G.DITTUS, in 'Methoden der organischen Chemie' (HOUBEN-WEYL-MÜLLER), 4.Aufl., Bd. VI/3, S. 454, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1965.
77) J.LAM, Phytochemistry 10, 647 (1971).
78) F.BOHLMANN und R.REINECKE, Chem.Ber. 99, 3437 (1966).
79) H.GÜNTHER, 'NMR-Spektroskopie', S.310, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1973.
80) H.BESL, Univ. Regensburg, persönliche Mitteilung.
81) W.STEGLICH, H.BESL und K.ZIPFEL, Z.Naturforsch. 29b, 96 (1974).
82) H.-U.WAGNER und R.GOMPPER, in 'The Chemistry of the quinonoid compounds' (S.PATAI), Part 2, Wiley Interscience, London 1974.
83) H.-W.WANZLICK und U.JAHNKE, Chem.Ber. 101, 3753 (1968).
84) H.BESL, A.BRESINSKY, R.HERRMANN und W.STEGLICH, in Vorbereitung.
85) R.SINGER, 'The Agaricales in Modern Taxonomy', Vaduz 1975.
86) B.HENNIG (MICHAEL/HENNIG), 'Handbuch für Pilzfreunde', Bd.2, Jena 1960.
87) R.N.JONES, C.L.ANGELL, T.ITO und R.J.D.SMITH, Can.J.Chem. 37, 2007 (1959).
88) M.BARFIELD und B.CHAKRABARTI, Chem.Rev. 69, 757 (1969).
89) D.H.WILLIAMS und I.FLEMING, 'Spektroskopische Methoden zur Strukturaufklärung', Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1979.
90) a) F.BOHLMANN, T.BURKHARDT und C.ZDERO, 'Naturally Occuring Acetylenes', Academic Press, London 1973;
b) F.BOHLMANN, Fortschritte d.Chem.org.Naturst. 25, 1 (1967).
91) a) P.M.HARDY, in 'Comprehensive Organic Chemistry' (BARTON und OLLIS), Bd. 5, 'Biological Compounds' (E.HASLAM, Hrsg.), S.187, Pergamon Press, Oxford 1979;

b) G.KRÜGER, in 'Methodicum Chimicum' (KORTE), Bd. 6, 'C-N Verbindungen' (F.ZYMALKOWSKI, Hrsg.), S.611, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974;

c) T.WIELAND, R.MÜLLER, E.NIEMANN, L.BIRKHOFER, A.SCHÖBERL, A.WAGNER und H.SÖLL in 'Methoden der organischen Chemie' (HOUBEN-WEYL-MÜLLER), 4.Aufl., Bd. X/2, S.310, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1958.

92) G.E.CLEMENT und R.POTTER, J.Chem.Educ. 48, 695 (1971).

93) J.B.JONES und J.F.BECK, in 'Applications of Biochemical Systems in Organic Chemistry' (JONES, SIH, PERLMAN, Hrsg.), Bd. X/1 der Reihe 'Techniques of chemistry' (A.WEISSBERGER), S.107, Wiley-Interscience, New York 1976.

94) a) S.P.L.SÖRENSEN, C.r.Trav.Carlsberg 6, 1 (1903); siehe Chem.Zentralbl. 1903 II, 33; Hoppe-Seyler's Z.Physiol. Chem. 44, 448 (1905);

b) H.STEPHEN und C.WEIZMANN, J.Chem.Soc. 1914, 1152.

95) a) F.WEYGAND, W.STEGLICH und H.TANNER, Liebigs Ann.Chem. 658, 128 (1962);

b) F.WEYGAND, W.STEGLICH, D.MAYER und W.PHILIPSBORN, Chem. Ber. 97, 2023 (1964).

96) H.-J.LOHRISCH und W.STEGLICH, Tetrahedron Lett. 1975, 2905.

97) Siehe Lit. [123] S. 666.

98) a) H.OEDIGER und F.MÖLLER, Angew.Chem. 79, 53 (1967);

b) H.OEDIGER, F.MÖLLER und K.EITER, Synthesis 1972, 591.

99) R.L.EDWARDS und M.GILL, J.Chem.Soc., Perkin 1, 1975, 351 und dort zitierte Literatur.

100) J.GRIPENBERG, Acta Chem.Scand. 12, 1762 (1958) und dort zitierte Literatur.

101) R.L.EDWARDS und N.KALE, J.Chem.Soc. 1964, 4084.

102) U.EISNER, J.A.ELVIDGE und R.P.LINSTEAD, J.Chem.Soc. 1953, 1372.

103) J.A.FINDLAY, J.M.MATSOULIAS und J.KREPINSKY, Can.J.Chem. 54, 3419 (1976).

104) J.E.JENSEN und K.TORSSELL, Acta Chem.Scand. B 32, 457 (1978).

105) E.C.TAYLOR, G.W.McLAY und A.McKILLOP, J.Am.Chem.Soc. 90, 2422 (1968).

106) O.HOLLITZER, A.SEEWALD und W.STEGLICH, Angew.Chem. 88, 480 (1976).

107) S.HÜNIG und M.KIESSEL, Chem.Ber. 91, 380 (1958).
108) W.STEGLICH, H.SCHMIDT und O.HOLLITZER, Synthesis 1978, 622.
109) H.SCHMIDT, Dissertation, Univ. Bonn 1979.
110) a) I.DYONG und H.BENDLIN, Chem.Ber. 111, 1677 (1978);
b) I.DYONG und N.JERSCH, Chem.Ber. 109, 896 (1976).
111) K.TORSSELL und M.P.TYAGI, Acta Chem.Scand. B 31, 297 (1977).
112) E.KEINAN und Y.MAZUR, J.Org.Chem. 43, 1020 (1978).
113) L.F.FIESER und M.FIESER, 'Reagents for Organic Synthesis', Bd.1, Wiley-Interscience, New York 1967.
114) Vgl. z.B. a) E.WACHSEN und K.HARTKE, Chem.Ber. 109, 1353 (1976) und dort zitierte Literatur;
b) A.MANNSCHRECK und H.DVORAK, Tetrahedron Lett. 1973, 547.
115) a) V.I.MINKIN, L.P.OLEKHNOVICH, Yu.A.ZHADANOV, Z.N.BUDARINA und V.P.MEILUSHENKO , Tetrahedron Lett. 1974, 563;
b) S.MASAMUNE, A.V.KEMP-JONES, J.GREEN und D.L.RABENSTEIN, J.Chem.Soc.Chem.Commun. 1973, 283.
116) E.WACHSEN und K.HARTKE, Chem.Ber. 108, 138 (1975).
117) W.STEGLICH, persönliche Mitteilung.
118) B.OERTEL, Univ. Bonn, persönliche Mitteilung.
119) B.STEFFAN, Univ. Bonn, danke ich für die Durchführung der Impfung.
120) P.R.SHILDNECK und R.ADAMS, J.Am.Chem.Soc. 53, 2373 (1931).
121) W.BAKER, J.Chem.Soc. 1931, 1765.
122) T.ANKE und F.OBERWINKLER, Institut für Biologie I der Univ. Tübingen.
123) F.WEYGAND und H.SIMON, in 'Methoden der organischen Chemie' (HOUBEN-WEYL-MÜLLER), 4.Aufl., Bd. IV/2, S.644, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1955.
124) EGA Katalog/Handbuch 1979/80, EGA-Chemie, Steinheim.
125) G.BARGER und T.E.WEICHSELBAUM, Org.Synth.Coll.Vol. II, 384 (1943).
126) K.BIEMANN, Mass Spectrometry, Organic Chemical Applications Mc Graw-Hill Series in Advanced Chemistry, Mc Graw-Hill, New York 1962.
127) H.-L.SCHMIDT, in 'Messung von radioaktiven und stabilen Isotopen' (H.SIMON, Hrsg.), S.291, Springer Verlag, Berlin 1974.

LEBENSLAUF

Name	Rupert Herrmann
geboren am	25.4.1950 in Urberach Kreis Dieburg
Schule	1956-1964 Voksschule in Urberach 1965-1969 Erwerb der Fachschulreife am Aufbauzug der Paul-Ehrlich-Schule in Frankfurt-Höchst (Freizeitunterricht)
Beruf	1964 Eintritt in die Höchst AG, Werk Frankfurt-Höchst 1964-1966 Anlernzeit zum Chemielaborjungwerker 1966-1968 Chemielaborantenlehre 1968-1969 Chemielaborant in der Kunststoff-Forschung
Studium	1969-1972 Chemieingenieurstudium an der Fachhochschule Darmstadt im Fachbereich Chemische Technologie April 1972-Juli 1972 Ingenieurarbeit auf dem Gebiet der Regelungstechnik Abschluß: Ingenieur (grad.) 1972-1976 Chemiestudium an der Technischen Universität Berlin Juli 1975-Februar 1976 Diplomarbeit am Institut für Organische Chemie bei Herrn Priv.Doz.Dr.H.Schwarz auf dem Gebiet der Massenspektrometrie Abschluß: Diplom-Ingenieur
Wissenschaftliche Tätigkeiten	April 1976 Beginn der Doktorarbeit am Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn bei Herrn Prof.Dr.W.Steglich April 1977-März 1980 Verwalter der Stelle